



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

**Expresión de inmunocitoquinas e  
inmunofenotipificación de células mononucleares de  
sangre periférica humana tratadas con la lectina de  
*Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi), ecotipo Patón Grande**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología

Molecular

**AUTOR**

Erasmus Honorio COLONA VALLEJOS

**ASESOR**

Libertad ALZAMORA GONZALES

Lima, Perú

2017



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Colona, E. (2017). *Expresión de inmunocitoquinas e inmunofenotipificación de células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con la lectina de Lupinus mutabilis Sweet (Tarwi), ecotipo Patón Grande*. [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

1304

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS ✓

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. N° 149-UPG-FCB-2017

8(2)  
85

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO  
DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR

Siendo las...10:15... horas del día 17.11.2017 en el Salón de Grados de la  
Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

Dr. Pablo Sergio Ramírez Roca	e integrado por
Dr. Dan Erick Vivas Ruíz	(Miembro)
Mg. Ruth Hortensia García de la Guarda	(Miembro)
Mg. Enrique Escobar Guzmán	(Miembro)
Dra. Libertad Alzamora Gonzales	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el Bachiller Don ERASMO HONORIO COLONA VALEJOS.

Después de darse lectura al Expediente N° 149-UPG-FCB-17, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

"EXPRESIÓN DE INMUNOCITOQUINAS E INMUNOFENOTIPIFICACIÓN DE CELULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA HUMANA TRATADAS CON LA LECTINA DE *Lupinus mutabilis* SWEET (TARWI) ECOTIPO PATÓN GRANDE", y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con el financiamiento del Proyecto Especial de Investigación del Rectorado (RR N° 03761-R-15), Proyecto PIBA del Vicerrectorado de Investigación (RR N°03912-R-15), Estudios CON CON 2014 (RR N° 00967-R-14) y 2015 (RR N° 00532-R-15).

***“Y si alguno imagina que sabe algo, aún no sabe nada como debe saberlo”***

**1 Corintios 8:2**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios quien siempre está a mi lado y que a pesar de haber estado atribulado, en apuros y derribado evitó que me angustiara, perdiera la calma y pensara estar destruido. Gracias Dios.

A mi esposa Mary quien siempre ha estado en el momento exacto para sostenerme y levantarme y, sobre todo acompañarme en este reto.

A mis padres Constantino y Bertha, hermanos y familia en general por siempre alentarme a seguir adelante.

A mi asesora, maestra, colega y sobre todo amiga, la Dra. Libertad Alzamora Gonzales, eternamente gracias, siempre serás mi maestra y guía.

Al Dr. Edgar Matos Benavides, Lic. José Manuel Guevara Canales y Lic. Rosario Inocente Malpartida por brindar los reactivos, equipo y orientación en el procesamiento de los datos para la realización de los ensayos por citometría de flujo en el Centro Referencia Nacional de Alergia e Inmunología del Instituto Nacional de Salud del Niño.

A la Mg. Carolina de Amat Herbozo por su gran apoyo en el procesamiento y lectura de los datos de citometría de flujo.

A la Dra. Evelyn Alvarez Salazar y la Mg. Ana Mayanga Herrera por su apoyo en la selección y eficiencia de primers.

Al Mg. Enrique Escobar, por su apoyo en los ensayos cromatográficos y la disponibilidad para atender nuestras interrogantes.

A mis alumnos y ahora colegas Emely, Luis Antonio y Ricardo por motivarme a concluir la tesis y siempre contar con su apoyo incondicional,

A los tesisistas y ayudantes del Laboratorio de Inmunología: Mónica, Julio, Dora Luisa, Andrés, Christian, Rosa, Jorge, Mary Luz y Luis por su apoyo en las prácticas y darme la oportunidad de poder redactar la tesis.

Al Dr. Félix Camarena y la Mg. Amelia Huaranga de la Universidad Agraria La Molina por la disposición de proveernos las semillas de tarwi.

## CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
LISTA DE TABLAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
4. MATERIAL Y MÉTODOS	14
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSIÓN	44
7. CONCLUSIONES	58
8. RECOMENDACIONES	59
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
10. ANEXOS	80



## RESUMEN

El proteoma de la semilla de *Lupinus mutabilis* consiste en una mezcla compleja de proteínas dentro del cual las lectinas tienen la capacidad de interactuar con células del sistema inmune. La finalidad del presente estudio fue determinar la expresión génica transcripcional de inmunocitoquinas y el inmunofenotipo de las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSPH) tratadas con la lectina semipurificada de *Lupinus mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande. El extracto proteico (EPG) elaborado a partir de la harina desengrasada de semillas de lupino se fraccionó mediante cromatografía de exclusión molecular. Las lectinas del extracto y fracciones se identificaron mediante la actividad hemaglutinante y SDS-PAGE. Las CMSPH se incubaron durante 24 y 72 h con el EPG (5 µg/mL), la fracción 9 del pico I (F9-PI 5 y 25 µg/mL), fitohemaglutinina (PHA, control positivo) y medio RPMI (control negativo). La expresión génica de las inmunocitoquinas e inmunofenotipificación se realizó mediante la PCR convencional y citometría de flujo respectivamente. El EPG y la F9-PI a la concentración de 5 µg/mL durante 24 y 72 h de incubación estimularon la expresión de IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  mRNA con respecto al control ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, la fracción F9-PI (25 µg/mL) a las 72 h de incubación aumentó significativamente la expresión de IL-10 ( $p < 0.05$ ). Las CMSPH tratadas con el EPG y la F9-PI a la concentración de 5 µg/mL durante 72 h no incrementaron el recuento total de linfocitos y monocitos, mientras que la F9-PI (25 µg/mL) aumentó significativamente el número total de monocitos con respecto a los controles ( $p < 0.05$ ). Se concluye que el EPG y la F9-PI estimulan la expresión de IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  mRNA, mientras que la lectina semipurificada a la concentración de 25 µg/mL eleva la expresión de IL-10 mRNA e induce el incremento del número total de monocitos CD4<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup>.

## PALABRAS CLAVE

*Lupinus mutabilis*, lectinas hemaglutinantes, células mononucleares de sangre periférica, inmunocitoquinas, inmunofenotipificación.

## ABSTRACT

The proteome of *Lupinus mutabilis* seed consists of a complex mixture of proteins within which lectins have the ability to interact with cells of the immune system. The purpose of the present study was to determine the gene transcriptional expression of immunocytokines and the immunophenotype of the human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC) treated with the semipurified lectin of *Lupinus mutabilis* Sweet, ecotype Patón Grande. The protein extract (EPG) prepared from the degreased meal of lupine seeds was fractionated by gel permeation chromatography. Lectins from the extract and fractions were identified by haemagglutinating activity and SDS-PAGE. The hPBMC were incubated during 24 and 72 h with the EPG (5 µg/mL), fraction 9 of peak I (F9-PI 5 and 25 µg/mL), phytohemagglutinin (PHA, positive control) and RPMI medium (negative control). Gene expression of immunocytokines and immunophenotyping was performed by conventional PCR and flow cytometry respectively. The EPG and the F9-PI at the concentration of 5 µg/mL during 24 and 72 h of incubation stimulated the expression of IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  mRNA with respect to the control ( $p < 0.05$ ). However, fraction F9-PI (25 µg/mL) at 72 h of incubation significantly increased the expression of IL-10 ( $p < 0.05$ ). The hPBMC treated with the EPG and the F9-PI at the concentration of 5 µg/mL for 72 h did not increase the total lymphocyte and monocyte count, while the F9-PI (25 µg/mL) significantly increased the total number of monocytes with respect to the controls ( $p < 0.05$ ). It is concluded that the EPG and the F9-PI stimulate the expression of IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$  mRNA, while the semipurified lectin at the concentration of 25 µg/mL increases the expression of IL-10 mRNA and induces the increase of the total number of monocytes CD4 + CD16-.

## KEY WORDS

*Lupinus mutabilis*, hemagglutinating lectins, peripheral blood mononuclear cells, immunocytokines, immunophenotyping.

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Diagrama de elaboración del extracto crudo proteico de <i>Lupinus mutabilis</i> , ecotipo Patón Grande.....	17
Figura 2. Perfil cromatográfico y SDS-PAGE del extracto proteico y fracciones de <i>L. mutabilis</i> Sweet, ecotipo Patón Grande.....	25
Figura 3. Actividad hemaglutinante del extracto proteico de <i>L. mutabilis</i> Sweet, ecotipo Patón Grande.....	26
Figura 4. Actividad hemaglutinante de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular.....	26
Figura 5. Concentración de proteínas del extracto crudo proteico y fracciones de <i>L. mutabilis</i> Sweet, ecotipo Patón Grande.....	27
Figura 6. Expresión del gen de la IL-1 $\alpha$ y el TNF- $\alpha$ inducida con la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> , ecotipo Patón Grande durante 24 horas.....	28
Figura 7. Expresión del gen de la IL-1 $\alpha$ y el TNF- $\alpha$ inducida con la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> , ecotipo Patón Grande durante 72 horas.....	29
Figura 8. Efecto de la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> ecotipo Patón Grande sobre la expresión génica de la IL-10 durante 24 y 72 horas.....	30
Figura 9. Efecto de la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> ecotipo Patón Grande sobre la expresión génica del TFG- $\beta$ durante 24 y 72 horas.....	32
Figura 10. Análisis de la expresión génica de la IL-2 en células mononucleares humana estimulada con la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> , ecotipo Patón Grande durante 24 y 72 horas.....	33
Figura 11. Análisis de la expresión génica del IFN- $\gamma$ en células mononucleares humanas inducida con la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> , ecotipo Patón Grande durante 24, 48 y 72 horas.....	35
Figura 12. Identificación de las poblaciones celulares CD3-CD16 <sup>bright</sup> y CD3+CD16 <sup>dim</sup> estimulada con la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> ecotipo Patón Grande.....	37

Figura 13. Análisis de la línea monocítica CD4+CD16- estimulada con la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> ecotipo Patón Grande.....	38
Figura 14. Identificación de las poblaciones celulares CD4+CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8- y CD4-CD8+ estimulada con la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> ecotipo Patón Grande.....	40
Figura 15. Análisis de los linfocitos CD3+CD25+ estimulados con la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> ecotipo Patón Grande.....	41
Figura 16 Análisis inmunofenotípico de las células CD3-CD19+ estimulada con la F9-PI de <i>L. mutabilis</i> ecotipo Patón Grande.....	42
Figura 17. Interacciones hipotéticas de la F9-PI 25 µg/mL de <i>L. mutabilis</i> con el IGF-1R y su efecto sobre la expresión génica transcripcional de citoquinas y la proliferación celular.....	59
Figura 18. Efecto hipotético de la interacción de la F9-PI 25 µg/mL de <i>L. mutabilis</i> sobre la proliferación de monocitos clásicos de sangre periférica.....	60

## LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Familia de lectinas en plantas (De Schutter & Van Damme 2015)....	9
Tabla 2. Lectinas de plantas que inducen la producción de citoquinas (Souza et al. 2013).....	11
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en la PCR para genes de citoquinas humanas.....	21
Tabla 4. Resultados de la densidad de señal de la expresión de mRNA de inmunocitoquinas normalizadas con la señal del control (GAPDH mRNA) mediante el programa ImageJ (NIH, USA).....	36
Tabla 5. Conteo total o absoluto de poblaciones de células mononucleares de sangre periférica humana, determinado por análisis de citometría de flujo.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

CD: *Cluster of differentiation*

CD3-CD16<sup>bright</sup>: Linfocitos Natural Killer (NK). Las células NK expresan una elevada densidad de CD16 (CD16 bright)

CD3+CD16<sup>dim</sup>: Linfocitos T Natural Killer (NKT). Las células NKT expresan baja densidad de CD16 (CD16 dim)

CD3+CD4+CD8-: Linfocitos T helper (LTh)

CD3+CD4-CD8+: Linfocitos T citotóxicos (LTc)

CD3+CD4-CD8-: Linfocitos T doble negativo (LTDN) que corresponden aproximadamente al 1-5% del total de linfocitos de sangre periférica que son probablemente linfocitos T  $\gamma\delta$ , células T regulatorias o NKT CD4-CD8-

CD3+CD4+CD8+: Linfocitos T doble positivo (LTDP) que corresponden el 3-5% del total de linfocitos T totales de sangre periférica. Presentan función supresora o citotóxica

CD3-CD19+: Linfocitos B

CD45+CD4+CD16-: monocitos clásicos

ConA: Concanavalina A

CMSPH: Células Mononucleares de Sangre Periférica Humana

CPA: Célula Presentadora de Antígenos

CXC: Quimioquinas  $\alpha$

CC: Quimioquinas  $\beta$

cDNA: DNA complementario

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

EPG: Extracto Proteico de Patón Grande

F9-PI: Fracción 9 de proteína (con lectina) de *L. mutabilis* obtenida por cromatografía de exclusión molecular-pico I

FSC: *Forward scatter* (Dispersión frontal, valor proporcional al tamaño celular)

FrP: Fracciones de lectinas de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande

GAPDH: Gliceraldehido 3-Fosfato Deshidrogenasa

GRCo: Glóbulos Rojos de Conejo

HEPES: (4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid)

HA: Actividad hemaglutinante

h: Hora

IL: Interleuquina

IGF-1R: Receptor del factor de crecimiento insulínico tipo 1

IR: Receptor de Insulina

IFN: Interferón

KDa: Kilodaltons

KML-C: Lectina del muérdago Koreano-Coloratum

LB: Linfocitos B

LT: Linfocitos T

min: Minutos

NK: Linfocitos Natural Killer. Presentan un inmunofenotipo CD3-CD16<sup>bright</sup>

NKT: Linfocitos T Natural Killer. Presentan un inmunofenotipo CD3+CD16<sup>dim</sup>

PI: Pico I obtenido por cromatografía de exclusión molecular

PII: Pico II obtenido por cromatografía de exclusión molecular

PIII: Pico III obtenido por cromatografía de exclusión molecular

PHA: Fitohemaglutinina

PMN: Polimorfonucleares

PEGE<sub>2</sub>: Prostaglandina E<sub>2</sub>

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad

mRNA: Ácido Ribonucleico mensajero

NIH: *National Institute of Health*

NO: Óxido Nítrico

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RNA: Ácido Ribonucleico

SDS: Sodio Dodecilsulfato

SDS-PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con SDS

SSE: Solución Salina de Extracción

seg: Segundos

SSC: *Side scatter* (dispersión lateral, proporcional a la cantidad de estructuras granulares o complejidad de la célula)

TNF: Factor de Necrosis Tumoral

TGF: Factor de Crecimiento Transformante

Th: Linfocitos T helper o auxiliador

Tr1: Linfocitos T regulador 1



## 1. INTRODUCCIÓN

La modulación del sistema inmunitario indica cualquier cambio en la respuesta inmune que puede implicar la inducción, expresión, amplificación o inhibición de cualquier parte o fase de la respuesta inmune. La actividad inmunomoduladora es un término general que indica un efecto biológico o farmacológico sobre factores humorales o celulares que actúan en la respuesta inmune natural y adaptativa con efectos inmunosupresores y/o inmunoestimuladores (Sánchez et al. 2003; Saroj et al. 2012).

Las plantas medicinales, en la actualidad satisfacen la atención primaria de salud por medio de extractos o principios activos (Sasidharan et al. 2011), lo cual reduce los costos al compararlo con el tratamiento de la medicina moderna. En la medicina tradicional se cree que diferentes partes de la planta tienen propiedades medicinales específicas incluyendo la capacidad de estimular los mecanismos de defensa del organismo (Zhu & Sang, 2017).

Un reducido número de plantas han sido seleccionadas para investigar sus actividades inmunoestimuladoras, pero debido a su inadecuada evidencia no permite su uso en la práctica clínica (Kumar et al. 2011). Sin embargo, las moléculas vegetales con actividad inmunomoduladora comprobada desde saponinas a lectinas constituyen una “mina de oro” inexplorada (Granell et al. 2010).

El término lectina deriva del latín “legere” que significa “seleccionar elegir o escoger”. Esta denominación fue propuesta por Boyd and Shapleigh (1954) para las aglutininas derivadas de plantas con capacidad de seleccionar glóbulos rojos de diferentes grupos sanguíneos (Espino 2015).

Las lectinas son un grupo de proteínas o glicoproteínas de origen no-inmune que comparten la propiedad de enlazarse de forma específica y reversible a los polisacáridos y glicoproteínas, ya sean libres o que formen

parte de estructuras más complejas (Sharon y Lis, 1998; Goldstein et al. 1980). Estas proteínas usualmente tienen al menos dos sitios de unión por molécula: un azúcar específico y una molécula glicosilada (Castillo y Abdullaev, 2005). En las plantas, las lectinas se han aislado principalmente de los cotiledones y endospermos de las semillas constituyendo del 2 al 10 % del total de proteínas de éstas (Hernández et al. 1999).

La familia Leguminosae tiene el grupo más grande de lectinas bien caracterizadas, que son de interés debido a una variedad de especificidades de carbohidratos y mayor disponibilidad en la naturaleza. En general, se ha atribuido una amplia gama de aplicaciones biológicas a las lectinas vegetales, tales como mediadores de la respuesta inflamatoria e inmune; antivirales, antibacterianos, antifúngicos y antihelmínticos, efecto curativo, adyuvantes de fármacos, marcadores histoquímicos, biosensores de enfermedades y actividades antitumorales (Coelho et al. 2017; Fohona et al. 2017).

Diferentes mecanismos de inmunomodulación han sido atribuidos a las lectinas de plantas; por ejemplo, la fitohemaglutinina (PHA), una lectina específica de N-acetilgalactosamina, extraída de *Phaseolus vulgaris* (frijol) presenta efecto inmunosupresor o proliferativo dependiendo de la dosis (Ruiz et al. 2005) o la Concanavalina A (ConA), lectina específica de manosa/glucosa aislada de las semillas de *Canavalia ensiformis* que ha sido determinada como agente mitogénico de células CD4+ e inhibidor de la proliferación de células tumorales entre otras lectinas estudiadas (Faheina et al. 2012).

El género *Lupinus* es miembro de la familia Leguminosae y presenta cuatro especies de importancia para la agricultura: *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* y *L. mutabilis* (Yorgancilar y Bilgiçli, 2014; Tapia 2015). Los estudios se realizan principalmente con las semillas de este género debido a su contenido de proteínas como lectinas; por ejemplo en las semillas de *L. mutabilis* Sweet “tarwi”, debido a su elevada proporción de globulinas, han

sido caracterizadas en su actividad de lectina (Falcón et al. 2000; Rodríguez 2017).

Existen estudios relacionados a lectinas del género *Lupinus*, basados en sus propiedades nutricionales, efecto hipercolesterolémico, hipoglicémico, actividad antiinflamatoria y antimicrobiana de sus alcaloides, pero hay escasa información acerca de su actividad inmunomoduladora (Fornasini et al. 2012; Ruiz et al. 2014; Foley et al. 2015).

El Perú tiene la ventaja de tener una de las especies de lupino con mayor contenido de proteínas que otras especies: *Lupinus mutabilis* (Kay 1985). Empleando extractos de *L. mutabilis* “tarwi” se han determinado las actividades antiinflamatoria, analgésica, antimicrobiana o sus efectos bioquímicos y hematológicos *in vivo* (Castañeda et al. 2002; Castañeda et al. 2007; Castañeda et al. 2013). Existen pocos estudios de los extractos o purificados proteicos con función de lectina sobre la población de células mononucleares humanas y su efecto modulador en la expresión de inmunocitoquinas.

Debido a la gran utilidad de las lectinas vegetales es necesario realizar estudios que permitan establecer las bases científicas para el uso de estas proteínas que podrían ser benéficos, neutros o perjudiciales (Gabiús 2001).

Recientemente el grupo de investigación MODULANS de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos ha caracterizado bioquímicamente la lectina de *Lupinus mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande (Rodríguez 2017), demostrando que se trata de la  $\gamma$ -conglutina coincidiendo con los reportes de investigadores como Duranti et al. (1994) y Ribeiro et al. (2014). Ante esta perspectiva se hace necesario continuar con la investigación e incrementar el conocimiento del efecto inmunomodulador de esta lectina con la finalidad de validar su uso como tratamiento complementario en patologías como leishmaniasis, tuberculosis, cáncer entre otras; en el diagnóstico o como adyuvante de vacunas, además de

proporcionarle valor agregado al tarwi, aumentar el consumo y mejorar la calidad de vida de los productores.

El presente estudio tuvo como objetivo determinar la expresión génica transcripcional de inmunocitoquinas y el inmunofenotipo de las células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con la F9-PI, una fracción hemaglutinante de *Lupinus mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Lupinus mutabilis* Sweet

El género *Lupinus* comprende más de 400 especies, pero solo cuatro son de importancia para la agricultura: *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* y *L. mutabilis* (Yorgancilar y Bilgiçli, 2014; Tapia 2015).

*Lupinus mutabilis* Sweet conocido como chocho, chochito, chuchus muti, tarwi, tarhui, tauri, ullush, talwish, lupino, altramuz o ccquella es una leguminosa oriunda de los andes de Perú, Bolivia y Ecuador, cuyas semillas desamargadas y cocidas son utilizadas por los pobladores andinos como alimento y medicina (Jacobsen y Mujica, 2006; Rodríguez, 2009).

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica de *Lupinus mutabilis* Sweet

De acuerdo a Camarena et al. (2012) y Vilcapoma (2002) la clasificación taxonómica del tarwi, es la siguiente:

Reino	Vegetal
División	Fanerógama
Clase	Dicotiledónea
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
Tribu	Genisteae
Género	<i>Lupinus mutabilis</i> Sweet

#### 2.1.2 Variabilidad y diversidad genética

El tarwi muestra una amplia diversidad genética con gran variabilidad en la arquitectura de la planta, adaptación a suelos, precipitación, temperatura, altitud y periodo vegetativo (Jacobsen y Mujica, 2006). Existe muy poca información sobre los miles de genotipos que posee el Perú, sin embargo, el sector agro nacional, por medio de algunas universidades públicas e instancias privadas, ha desarrollado el incremento de ecotipos cultivables y mejoramiento de los mismos llegando a ser el país con más variedades de *L. mutabilis* en el mundo (Quispe 2015).

### 2.1.3 Valor nutritivo

*Lupinus mutabilis* Sweet, domesticada desde la época inca, posee elevado valor nutricional, sin embargo su consumo es bajo, esto influye en la producción agrícola por lo que es considerado un cultivo “huérfano”. Este recurso, constituye una fuente de ingreso y sobrevivencia para los pequeños productores que podrían ser beneficiados si los estudios que se realizan para descubrir su propiedad como alimento funcional incrementaran el valor del cultivo, debido a que los pequeños agricultores resultan ser los más pobres en las cadenas productivas (Camarena, 2012; Jacobsen y Mujica, 2006; Tapia et al. 2000).

El tarwi es rico en proteínas y grasas por lo cual es una excelente opción para sustituir o reducir el consumo de proteína animal y evitar problemas de desnutrición. El contenido de proteínas puede variar entre 24.8 y 49.8 % dependiendo del tipo de colección de tarwi (Tapia, 2015). Sosa (2000) reportó la mayor concentración de proteína (43.07%) en *L. mutabilis* en relación a otras variedades como *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus*. Recientemente Gutiérrez et al. (2016) reportaron una concentración de 53.2 % de proteína en la semilla de tarwi (*L. mutabilis*) obtenido de la región Junín. El incremento de la concentración de proteína se puede conseguir cuando se extraen los lípidos y alcaloides (Tapia, 2015). Además el contenido proteico del tarwi es rico en globulina, albúmina, aminoácidos azufrados y calcio total que necesita nuestro organismo diariamente (77.5 mg) (Camarena et al. 2012).

Por otro lado, el escaso consumo de tarwi se atribuye a la presencia de factores no nutricionales que incluyen alcaloides, fitatos, oligosacáridos de rafinosa y lectinas (Mori et al. 2008; Tapia et al. 2000; Schoeneberger et al. 1984). Sin embargo, el desarrollo de trabajos de mejoramiento genético puede explotar las mejores características de este recurso, tal como se ha conseguido con algunas accesiones que contienen menor cantidad de alcaloides (Camarena, 2012).

#### **2.1.4 Usos medicinales y agronómicos**

El conocimiento tradicional en la cultura Aymara en Puno, le atribuye al tarwi efectos sobre la diabetes, males renales, hepáticos y eliminación de ectoparásitos (Jacobsen y Mujica, 2006). Algunas de estas propiedades han sido demostradas, así por ejemplo el extracto proteico total desengrasado de *L. albus* mostró significativo efecto hipocolesterolemizante e hipotrigliceridemiante (Sirtori et al. 2004; Spielmann et al. 2007). El extracto metanólico de *L. mutabilis* Sweet presentó efecto analgésico (Castañeda et al. 2013). Huamán et al. (2013) determinaron la actividad tripanocida y antileishmania del extracto acuoso de semillas de *L. mutabilis* Sweet. Recientemente Chauca (2016) demostró el efecto leishmanicida de las lectinas presentes en el extracto de *L. mutabilis* de los ecotipos Compuesto Blanco Semiprecoz y las fracciones de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande. Además, se ha determinado que el extracto acuoso de semillas de *L. mutabilis* inhibió el crecimiento micelial en hongos fitopatógenos como *Alternaria solani* y *Fusarium solani* (Yepes et al. 2009).

#### **2.1.5 Situación general del Tarwi**

De acuerdo al Ministerio de Agricultura y Riego (MINAGRI), la producción de tarwi se centra en los departamentos de La Libertad, Cusco, Puno, Huancayo y Cajamarca, entre otros (MINAGRI, 2015). En el Perú, la producción y consumo de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) se ha revalorado en los últimos años debido a su riqueza nutricional (Aguilar 2015), esta planta crece de forma natural y en otros casos es cultivada por sus deliciosas semillas. Lamentablemente, existen pocos estudios llevados en laboratorio sobre este vegetal y sus ecotipos y, muchas de sus ventajas no han sido estudiadas o están en fase preliminar (Chirinos 2015; Quispe 2015).

#### **2.1.6 La $\gamma$ -Conglutina**

Es una globulina conservada presente en las semillas del género *Lupinus* (Magni et al. 2004). Inicialmente no se le encontró capacidad

hemaglutinante ni otros roles fisiológicos (Duranti et al. 1994), sin embargo, Ribeiro et al. (2014) determinaron la actividad hemaglutinante de la  $\gamma$ -Conglutina en *L. albus*. Por otro lado, Rodríguez (2017) describió las propiedades bioquímicas y demostró la actividad hemaglutinante de la fracción y lectina purificada de *L. mutabilis* cuyo peso molecular corresponden a la  $\gamma$ -Conglutina.

## **2.2 Lectinas**

### **2.2.1 Definición**

Las lectinas son un grupo heterogéneo de proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que se une a carbohidratos a través de sitios moleculares con alta afinidad y especificidad, interactuando con mono u oligosacáridos por medio de uniones de hidrógeno, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas, con reversibilidad, alta especificidad y ninguna actividad catalítica o inmune (Coelho et al. 2017). Las lectinas, están presentes en frutos, semillas y vegetales con actividad biológico-funcional y potencial benéfico a la salud humana (Vázquez et al. 2012). Estas moléculas tienen importancia en la investigación biomédica y se han utilizado en estudios de interacción carbohidrato-proteína, aglutinación, tipificación de grupos sanguíneos, estimulación mitogénica, inhibición de la fagocitosis, inmunosupresión, toxicidad celular, inhibición del crecimiento fungal, bacteriana y viral, propiedades insecticidas, anti-VIH, anticancerígenas, marcador de células nerviosas, inactivadores ribosomales de neuronas, actividad tipo nucleasa, detección de anormalidades cromosómicas, entre otros (Hernández et al. 2005; Castillo & Abdullaev 2005; Hivrale & Ingale, 2013).



### 2.2.2 Clasificación

Las lectinas pueden dividirse en 12 familias en base al dominio conservado de reconocimiento de carbohidratos (Tabla 1) (De Schutter & Van Damme 2015).

**Tabla 1.** Familia de lectinas en plantas y sus ligando glucídicos (De Schutter & Van Damme 2015)

Familia de Lectina Vegetal	Típico Ligando Glucídico	Localización
Familia de lectina de <i>Agaricus bisporus</i>	GlcNAc/GalNAc, Galactosa	Núcleo, citosol
Familia Amarantina	GalNAc	Núcleo, citosol
Familia de aglutininas relacionadas a Quitinasa	N-glicanos ricos en manosa	Vacuola, unidas a membrana
Familia Cianovirina	Manosa	Núcleo
Familia de lectina de <i>Euonymus europaeus</i>	Galactósidos, N-glicanos ricos en manosa	Núcleo, citosol
Familia de lectina de <i>Galanthus nivalis</i>	Manosa	Vacuola, núcleo, citosol o unidas a membrana
Familia Heveina	Quitina	Vacuola
Familia Jacalina	Manosa y galactosa	Núcleo, citosol, vacuola
Familia de lectinas de leguminosa	Manosa	Vacuola, núcleo, citosol o unidas a membrana
Familia LysM	Quitina, peptidoglicano	Vacuola, núcleo, citosol o unidas a membrana
Familia de lectina de <i>Nicotiana tabacum</i>	(GlcNAc) <sub>n</sub> , N-glicanos complejos y ricos en manosa	Núcleo, citosol
Familia Ricina-B	Gal/GalNAc, Gal sialilada / GalNAc	Vacuola, núcleo, citosol

### 2.3 Inmunomoduladores de origen vegetal

Los inmunomoduladores son cada vez más considerados en la industria de los productos naturales, llegando en algunos países a tener más importancia que la industria farmacéutica, debido a que la población ha comenzado a tener conciencia de la importancia de un sistema inmunológico óptimo para el mantenimiento de la salud, prevención o recuperación después de una enfermedad (Ramasundaram et al. 2005).

Los productos naturales y sus componentes pueden ser una fuente importante de moléculas con propiedades inmunomoduladoras interesantes

(Sánchez et al., 2002). La búsqueda puede estar dirigida hacia compuestos inmunoestimulantes para el tratamiento de cáncer e infecciones, compuestos que regulen o supriman respuestas inmunes no deseadas (hipersensibilidades, enfermedades inflamatorias o autoinmunes) o como adyuvantes para las vacunas (Patwardhan & Gautam, 2005).

### **2.3.1 Lectinas de plantas como inmunomoduladores**

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* han definido el papel que juegan las lectinas como moduladores de la respuesta inmune contra el cáncer y activación de los linfocitos T (Reyes et al. 2011). Algunas lectinas de plantas ejercen su actividad inmunomoduladora interaccionando con glicanos presentes en la superficie de las células inmunes, desencadenando señales de transducción para producir citoquinas e inducir una eficiente respuesta inmune contra tumores o infecciones microbianas (Tabla 2) (Souza et al. 2013).

Algunas lectinas presentan efectos inmunomoduladores como la actividad mitogénica e inducción de la respuesta Th1, Th2 o Th17. Estos efectos se inician con la unión de las lectinas a glicanos en la superficie celular (receptores de lectinas, dominios estimulantes, receptor células T entre otros) induciendo la respuesta inmune a través de segundos mensajeros (diacilglicerol e inositol 1, 4,5 trifosfato), incremento de los niveles de  $Ca^{+2}$  citosólico y liberación de citoquinas específicas (Coelho et al. 2017).

**Tabla 2.** Lectinas de plantas que inducen la producción de citoquinas (Souza et al. 2013)

Lectina	Fuente	Citoquina
ArtinM	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	IL-12 e IL-10 (macrófagos y células dendríticas murino) (TNF- $\alpha$ mastocitos de murino) IL-10/IFN- $\gamma$ (esplenocitos murino)
Banlec	<i>Musa paradisiaca</i>	IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-4 (esplenocitos murino)
ConA	<i>Canavalia ensiformis</i>	IFN- $\gamma$ (esplenocitos murino) IFN- $\gamma$ and IL-2 (esplenocitos murino) IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ (células mononucleares de sangre periférica-PBMCs)
Conbr	<i>Canavalia brasiliensis</i>	IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ (PBMCs humanos) IFN- $\gamma$ (esplenocitos murino)
Cramoll	<i>Cratylia mollis</i>	IFN- $\gamma$ (esplenocitos murino)
DrosL	<i>Dioclea rostrata</i>	IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ (PBMCs humanos) TNF- $\alpha$ and IL1- $\beta$ (cavidad peritoneal de rata)
Dviol	<i>Dioclea violacea</i>	IL-5 (PBMCs humanos)
Dvirl	<i>Dioclea virgata</i>	IL-5, IL-10, TNF- $\alpha$ , and IFN- $\gamma$ (PBMCs humanos)
ASA-I	<i>Allium sativum</i>	IFN- $\gamma$ and IL-12 (esplenocitos murino)
KML	<i>Viscum album var. coloratum</i>	IL-12 (células dendríticas humanas)
ML-I	<i>Viscum album</i>	IL-12 (PBMCs humanos) IL-15 (neutrófilos humanos) IL-6, TNF- $\alpha$ , e IL-10 (PBMCs humanos)
PAA	<i>Pisum arvense</i>	IFN- $\gamma$ (esplenocitos murino)
PHA	<i>Phaseolus vulgaris</i>	IFN- $\gamma$ and IL-2 (esplenocitos murino)
PSA	<i>Pisum sativum</i>	IFN- $\gamma$ and IL-2 (esplenocitos murino)
PWM	<i>Phytolacca americana</i>	TNF- $\alpha$ , IL-12, and IL-6 (PBMCs humanos)
ScLL	<i>Synadenium carinatum</i>	IFN- $\gamma$ and IL-10 (fluido del lavado broncoalveolar murino-BALF)
UEA-1	<i>Ulex europaeus</i>	IL-2 and IFN- $\gamma$ (bazo de ratón)
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	IL-12 and IFN- $\gamma$ (esplenocitos murino)

ArtinM: lectina de *Artocarpus heterophyllus*; Banlec: Lectina de *Musa paradisiaca*; ConA: Concanavalina; Conbr: lectina de *Canavalia brasiliensis*; DrosL: Lectina *Dioclea rostrata*; Dviol: lectina de *Dioclea violacea*; Dvirl: lectina de *Dioclea virgata*; ASA-I: lectina del “ajo” *Allium sativum*; KML: lectina del muérdago Koreano; ML-I: lectina de muérdago I; PAA: aglutinina de *Pisum arvense*; PHA: Fitohemaglutinina; PSA: Aglutinina de *Pisum sativum*; PWM: lectina de *Phytolacca americana*; ScLL: lectina latex de *Synadenium carinatum*; UEA-1: aglutinina de *Ulex europaeus*; WGA: aglutinina del germen de trigo.

La fitohemaglutinina (PHA) es una lectina específica N-acetilgalactosamina de *Phaseolus vulgaris*. Las propiedades inmunomoduladoras de la fitohemaglutinina (PHA) se basan en inducción de la proliferación *in vitro* de linfocitos. Ruiz et al. (2005) evaluaron la PHA de dos variedades de frijol “Cueto” y “Judía roja santo”, determinando que la PHA obtenida de *Phaseolus vulgaris* de la variedad “Cueto” estimulaba la producción de anticuerpos. Sin embargo, se ha comprobado que la PHA posee un efecto supresor dependiente de la dosis sobre la respuesta inmune humoral y celular (Folch et al. 1983).

La Concanavalina A (ConA) es la lectina de *Canavalia ensiformis* que une específicamente moléculas de  $\alpha$ -D-glucosa y  $\alpha$ -D-manosa. La ConA presenta propiedades duales que hacen que pueda realizar tanto inducción autofágica directa sobre células diana (tumores) como también actividad inmunomoduladora indirecta en linfocitos, debido a su unión específica a manosa (Lei & Chang 2007). La estimulación de monocitos y macrófagos

THP-1 con ConA inhibe la expresión de la IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 y el TNF- $\alpha$  con excepción de la IL-8 (Chanput et al. 2010). Sin embargo, se ha determinado que esta lectina estimula directamente los monocitos para producir citoquinas como el TNF- $\alpha$  y la IL-1 $\beta$  y, activar linfocitos que secretan el IFN- $\gamma$  y estimulan la expresión de CD40 en la superficie de monocitos, promoviendo su interacción con los linfocitos y posterior diferenciación en macrófagos (Chen et al. 2012). Recientemente se ha demostrado que la lectina Cbol de *Canavalia boliviana* inhibe la migración de neutrófilos y el edema de la pata inducida por carragenano (Bezerra et al. 2014).

La aglutinina 1 del muérdago estimula la fagocitosis de células polimorfonucleares (PMN) pero presenta un débil efecto sobre macrófagos, mientras que la ConA estimula la actividad fagocítica en macrófagos (Stoika et al. 2001). El extracto del muérdago Europeo (*Viscum álbium* Loranthaceae) estimula la actividad de monocitos y macrófagos, incrementa la actividad de las células NK, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la producción de citoquinas (Hajto et al. 1989). Yoon et al. (2001) determinaron que la lectina de *Viscum album coloratum* (muérdago Koreano o KML-C) mezclada con un antígeno incrementó significativamente el título de anticuerpos IgG1, IgG2a e IgG2b relacionados con la respuesta tipo Th1 y Th2.

Lee et al. (2009) determinaron que la lectina KLM-C incrementó la actividad de células NK y macrófagos, la producción de óxido nítrico (NO), IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , la proporción del peso del bazo y timo y, el número de células CD4+ y CD8+. Además demostraron que KLM suprime los niveles de aspartato aminotransferasa (AST), lactato deshidrogenasa (LDH), y fosfatasa alcalina (ALP) marcadores de daño al corazón, músculo e hígado respectivamente.

La lectina de frijol mungo induce la expresión de citoquinas como la IL-1, IL-2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  en células mononucleares humanas presentando efectos inmunoestimulantes y antiinflamatorios. Además, la aglutinina del germen de trigo (WGA) estimula la actividad fagocítica en

polimorfonucleares de sangre periférica humana (PMN) y macrófagos a bajas concentraciones (0.5-1.0 µg/mL), mientras que a altas concentraciones (5-10 µg/mL) inhibe el proceso fagocítico (Jeune et al. 1999).

La aglutinina *Abrus* (AAG) obtenida de las semillas de *Abrus precatorius* promueve efectos antitumorales debido a la producción de NO por células de la inmunidad natural e inmunomodulación por citoquinas tipo Th1 (IL-2 e IFN-γ) (Ghosh & Maiti 2007). Estudios realizados con la lectina extraída de las semillas de *Cratylia mollis* Mart. han demostrado su capacidad de inducir en linfocitos murinos respuesta Th1 a través de la producción del IFN-γ, y suprimir la producción de óxido nítrico. Además, se ha observado que incrementó la producción de la IL-2, IL-6 y el IFN-γ pero redujo niveles de la IL-10 en esplenocitos de ratón (de Melo et al. 2010b; de Melo et al. 2011).

Con relación al género *Lupinus* existen escasos estudios en la actividad inmunomoduladora de los extractos proteicos o fracciones parcialmente purificadas o purificadas con actividad hemaglutinante. Recientemente se ha reportado que hidrolizados proteicos de *L. angustifolius* atenúan la expresión de genes de citoquinas proinflamatorias (TNF-α, IL-6, IL-1β) e incrementan la expresión de marcadores antiinflamatorios (CCL18) (Millán et al. 2014a, 2014b).

En el Perú, estudios realizados con extracto de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande sobre CMSPh han determinado la activación del receptor de la IL-2 (CD25), mientras que la lectina de la fracción no presentó variaciones en los porcentajes de las poblaciones CD4+ y CD8+ (de Amat, 2015). Chauca (2016) encontró un incremento en la producción de NO en macrófagos murinos tratados con el extracto de *L. mutabilis* ecotipo Compuesto Blanco Semiprecoz. Rodríguez (2017) determinó que las lectinas purificadas de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande no afectaron la producción NO en leucocitos totales y PMN humanos. Además, demostró que la lectina purificada reduce la producción de especies reactivas de oxígeno en PMN humanos.

Por lo tanto, es imprescindible que se realicen estudios que permitan conocer cómo las lectinas de *Lupinus mutabilis* modulan la expresión génica transcripcional de citoquinas importantes en la respuesta inmune y la población de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSPH) con la finalidad de validar científicamente los extractos o fracciones y garantizar su utilización como inmunomoduladores o herramientas de diagnóstico.

### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

#### **3.1 Hipótesis**

La lectina de *Lupinus mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande ejerce efecto inmunomodulador *in vitro* sobre la expresión génica transcripcional de inmunocitoquinas y la activación de células mononucleares de sangre periférica humana.

#### **3.2 Objetivo General**

Determinar la expresión génica transcripcional de inmunocitoquinas y el inmunofenotipo de las células mononucleares de sangre periférica humana tratadas con la lectina de *Lupinus mutabilis* Sweet, del ecotipo Patón Grande.

#### **3.3 Objetivos Específicos**

- 3.3.1 Obtener el extracto crudo de *Lupinus mutabilis* Sweet ecotipo Patón Grande.
- 3.3.2 Purificar parcialmente la lectina a partir de extractos de *Lupinus mutabilis* Sweet ecotipo Patón Grande.
- 3.3.3 Determinar el efecto de la fracción parcialmente purificada de la lectina sobre los niveles de expresión transcripcional para la IL-1 $\alpha$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 y TGF- $\beta$ .
- 3.3.4 Establecer el inmunofenotipo de las células mononucleares de sangre periférica humana cultivadas con la fracción semipurificada de la lectina.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

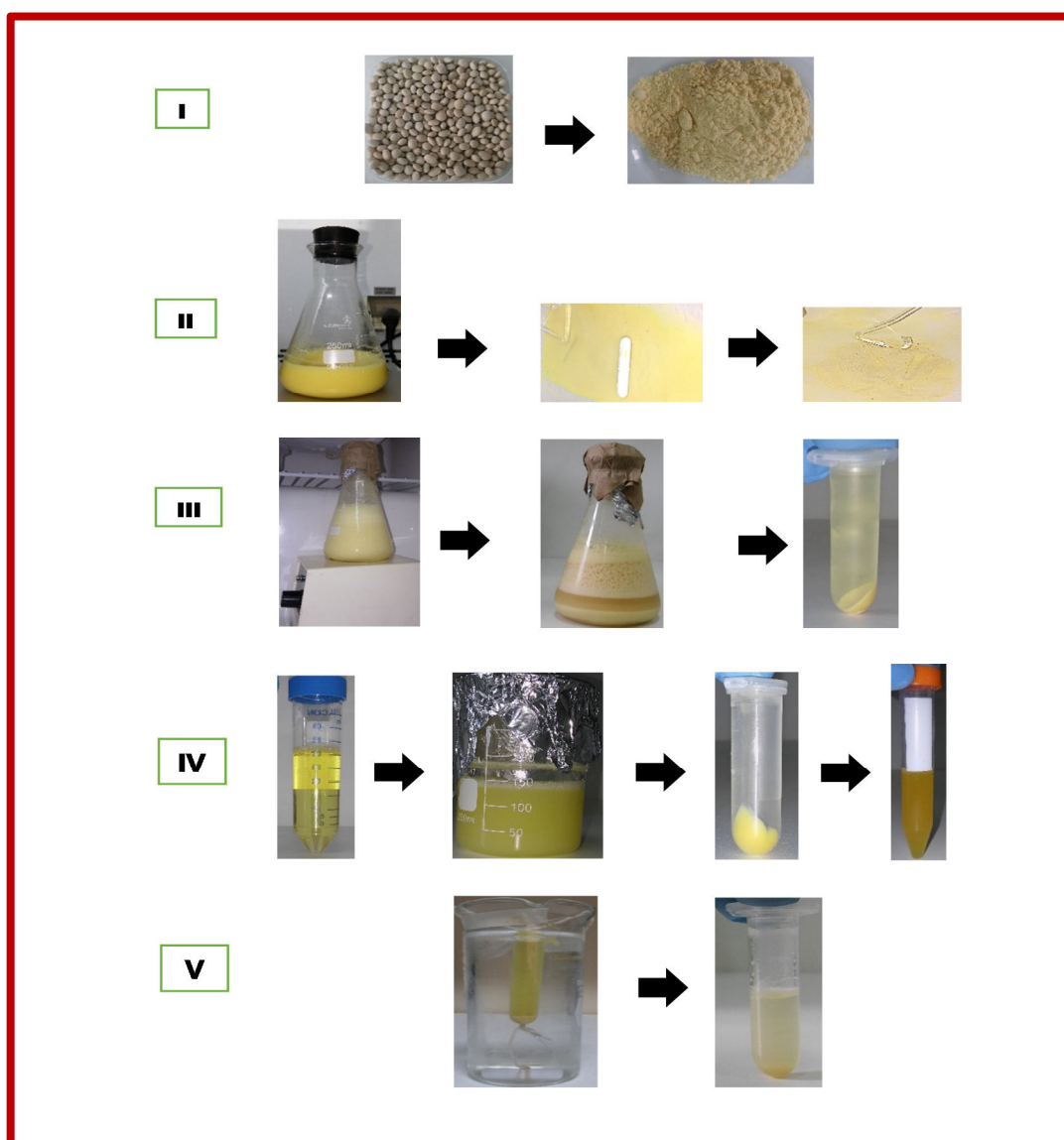
### 4.1 Selección de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande

Las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande fueron proporcionados por el Programa de Leguminosas, Granos y Oleaginosas de la Universidad Nacional Agraria La Molina (UNALM).

### 4.2 Elaboración del extracto crudo desengrasado de *L. mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande

Se realizó de acuerdo al protocolo de extracción reportado por Rodriguez (2017). Para este fin, se pesaron 10 gramos de la harina desengrasada que se maceraron en 100 mL de solución salina de extracción estéril (SSE, ClNa 0.15M, Cl<sub>2</sub>Ca 20 mM, Cl<sub>2</sub>Mn 20mM) (Anexo 1). Luego se realizó una agitación vigorosa durante 2 min y se mantuvo en agitación constante a 500 rpm durante 3 h a 4°C y sin agitación a 4°C durante toda la noche. El sobrenadante se colocó en microtubos y se centrifugó a 17800 g durante 15 min a 4°C. La harina sedimentada se maceró nuevamente con SSE en agitación constante a 500 rpm durante 1 h a 4°C y se filtró en gasa estéril. La fase líquida obtenida fue colocada en microtubos y centrifugada en condiciones similares. El sobrenadante se colectó en tubos 50 mL (Corning) y se mantuvo a 4°C durante el procesamiento. Para la precipitación de proteínas se calculó la cantidad de sulfato de amonio al 80% mediante el servidor online EncorBio (<http://www.encorbio.com/protocols/AM-SO4.htm>). Se añadió sulfato de amonio al sobrenadante contenido en un vaso de precipitación y se mantuvo en agitación constante con una barra magnética a 500 rpm durante 90 min a 4°C. Posteriormente la solución precipitada se centrifugó a 17800 g durante 30 min. Los *pellets* se resuspendieron en SSE y se dializaron contra SSE a 4°C con dos cambios de la solución. Finalmente el extracto recuperado de la bolsa de diálisis, fue inmediatamente alicuotado y almacenado a -20°C hasta su uso.





**Figura 1.** Diagrama de elaboración del extracto crudo proteico de *Lupinus mutabilis*, ecotipo Patón Grande. I) Semillas de *L. mutabilis*, ecotipo Patón Grande y harina de tarwi tamizada. II) Desengrasado de la harina de tarwi y secado durante 48-72 h. III) Maceración en la SSE, centrifugación y obtención del sobrenadante. IV) Precipitación del sobrenadante con SSSA 80%. V) Dializado del precipitado y obtención del extracto crudo proteico.

#### 4.3 Purificación parcial del extracto crudo proteico de *L. mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande

La cromatografía de exclusión molecular se realizó de acuerdo a lo descrito por Rodríguez (2017). Para este fin, se emplearon columnas de Sephadex G-75 de 25 cm de altura y 1.1 cm de diámetro. El volumen del

gel fue de 24 mL y el volumen muerto de 8 mL. La columna se equilibró con 4 volúmenes de buffer HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethanesulfonic acid) 10 mM, ClNa 0.15 M, Cl<sub>2</sub>Ca 2mM, Cl<sub>2</sub>Mn 2mM pH 6.8 (Buffer HEPES-NaCaMn) (Anexo 2) durante 24 h. Luego se cargó 1 mL del extracto crudo sobre la columna y se colectaron manualmente 45 fracciones de 1 mL para elaborar el patrón cromatográfico. La velocidad de flujo fue de 0.2 mL/h. Las fracciones se leyeron a 280 nm. La identificación de las proteínas en el extracto y las fracciones se realizó por SDS-PAGE según Laemmli (1970) con ciertas modificaciones (Anexo 3).

#### 4.4 Ensayos de la actividad hemaglutinante del extracto y las fracciones de *L. mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande

El criterio universal para la identificación *a priori* de lectinas es su capacidad hemaglutinante sobre eritrocitos de diferentes especies, que también se aplicó en el estudio. Se emplearon glóbulos rojos de conejo (GRCo) lavados en solución salina fisiológica (SSF, pH 7.0) y tripsinizados al 0.1% (Anexo 4). Luego se realizó una suspensión de GRCo al 2% en SSE. El ensayo se efectuó en microplacas de 96 pocillos con diluciones dobles del extracto y las fracciones. Posteriormente se incubó la placa a 20°C durante 30 min a 80 rpm en una incubadora con agitación constante. Las pruebas se realizaron por duplicado (de Amat 2015).

#### 4.5 Determinación de la concentración de proteínas en extractos y fracciones de *L. mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande

El extracto y las fracciones se cuantificaron mediante el método de Bradford (Bradford 1976) o el método fluorométrico Qubit de acuerdo a las indicaciones del producto. Por el método de Bradford las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro a 595 nm y se determinó la concentración de proteínas mediante una curva de calibración con seroalbúmina bovina (BSA).

#### 4.6 Evaluación de la producción de citoquinas pro y antiinflamatorias

##### 4.6.1 Cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana (CMSPH)

La sangre periférica se obtuvo de personas saludables en tubos heparinizados por punción venosa, previo consentimiento informado de acuerdo a la Declaración de Helsinki (Barrios et al. 2016). Las CMSPH se diluyeron con PBS 0.15 M en la proporción 1:2, se depositó en una solución de Ficoll-Hypaque y centrifugó a 1500 rpm durante 25 min a temperatura ambiente. Las células se lavaron una vez con PBS 0.15 M y dos veces con RPMI-1640 completo. Las CMSPH se resuspendieron en RPMI-1640 completo enriquecido con suero bovino 10% y suplementado con Hepes 25mM, bicarbonato de sodio 23 mM, aminoácidos no esenciales y antibióticos como penicilina (100 UI/mL) y estreptomicina (100 µg/mL). El recuento diferencial se realizó en cámara de Neubauer mediante microscopia óptica empleando azul de tripán al 0.4% para determinar la viabilidad celular. En cada pocillo se colocaron 100-500 µL de  $1 \times 10^6$  células/mL.

##### 4.6.2 Determinación de la expresión mRNA y síntesis de cDNA para citoquinas IL-1 $\alpha$ , IL-2, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 y TGF- $\beta$

Las CMSPH tratadas con las concentraciones del extracto, la fracción y los controles (PHA y RPMI) fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 5 min a 10°C. El RNA total se obtuvo empleando el kit *GeneJET RNA Purification*, #K0739 *Thermo Scientific* siguiendo las especificaciones del fabricante. El RNA total se cuantificó por fluorometría mediante el uso del fluorómetro Qubit 3.0 (Invitrogen). Para la transcripción reversa del RNA total se utilizó el kit *Maxima First Strand cDNA Synthesis for RT-qPCR* (#K1649, *Thermo Scientific*) siguiendo las especificaciones del fabricante. Previamente el RNA fue predenaturado a 65°C durante 5 min. Para la reacción se colocaron 4 µL del Mix de reacción 5X, 2µL del Mix Maxima Enzyme, 6 µL de agua libre de nucleasas y RNA total a la concentración de 50 ng/µL hasta obtener un volumen final de reacción de 20 µL. Las muestras se colocaron en un

termociclador *Bioer Technology* (versión 2009-1.6), incubándose a 25°C durante 10 min, 50°C durante 15 min y 85°C durante 5 min para terminar la reacción. El cDNA obtenido fue diluido 1/10 y posteriormente congelado a –20°C hasta su uso en la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional.

#### 4.6.3 Reacción en cadena de la polimerasa convencional

Se empleó el *kit Master mix PCR Platinum Master Mlx (Invitrogen)* de acuerdo a las especificaciones de manufactura. Para la reacción se colocaron 17 µL *Platinum Master Mlx*, 1 µL primer *Forward* (0.5 µM), 1 µL primer *Reverse* (0.5 µM), 1 µL cDNA (aproximadamente 100 ng/µL). Las muestras se colocaron en un termociclador *Bioer Technology* (versión 2009-1.6) de acuerdo al siguiente protocolo: desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, una fase de 35 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg., alineamiento 57°C durante 30 seg., extensión a 72°C durante 45 seg y, posteriormente una extensión final de 72°C durante 7 min. En el proceso de PCR convencional se utilizaron oligonucleótidos específicos para las citoquinas y oligonucleótidos específicos para la amplificación del gen GAPDH como control interno endógeno para el análisis semicuantitativo de la expresión génica (Tabla 3). La selección de los *primers* se realizó mediante búsqueda bibliográfica, mientras que su eficiencia se determinó a través del uso de Primer BLAST y la herramienta bioinformática Oligoanalyzer 3.1.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados en el PCR para genes de citoquinas humanas

Citoquina	Tamaño aproximado (pb)	Oligonucleótidos	Temperatura de Alineamiento (°C)	N° acceso Gen Bank	Referencia
IL-1 $\alpha$	421	F 5' GTCTCTGAATCAGAAATCCTTCTATC 3' R 5' CATGTCAAATTTCACTGCTTCATCC 3'	59	NM_000575.3	Cheng et al. 2008
IL-2	262	F 5' GTCACAAACAGTGCACCTAC 3' R 5' CCCTGGGTCTTAAGTAAAG 3'		NM_000586.3	Reichert et al. 2000
TNF- $\alpha$	360	F 5' GTCAGATCATCTTCTCGAACC 3' R 5' CAGATAGATGGGCTCATACC 3'		NM_000594.3	Larrea et al. 1996
IFN- $\gamma$	236	F 5' TGACCAGAGCATCCAAAAGA 3' R 5' CTCTTCGACCTCGAAACAGC 3'		NM_000619.2	Munk et al. 2011
IL-10	351	F 5' AATAAGGTTTCTCAAGGGGCT 3' R 5' AGAACCAAGACCCAGACATCAA 3'		NM_000572.2	Turrel-Davin et al. 2011
TGF- $\beta$	279	F 5' GCGTGCTAATGGTGGAAC 3' R 5' CGGTGACATCAAAAGATAACCAC 3'		NM_000660	Stanilov et al. 2016
GAPDH	218	F 5' TCCCTGAGCTGAACGGGAAG 3' R 5' GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT 3'		BC083511.1	Zainuddin et al. 2010

#### 4.6.4 Electroforesis en gel de Agarosa

Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. La electroforesis se realizó empleando buffer TAE 1X (Anexo 5). Las muestras se separaron a 100 V durante 60 min aproximadamente y el gel fue teñido con un marcador fluorescente de DNA (*fluorescent DNA loading dye, GeneON GmbH*) y se observó en un fotodocumentador (Enduro™ GDS, Labnet). Las bandas fueron fotografiadas para su cuantificación densitométrica empleando el programa ImageJ (NIH, USA). Los valores fueron normalizados considerando la proporción de las densidades de mRNA de las citoquinas *versus* la densidad de mRNA de GADPH (control interno) para cada uno de los tratamientos (EPG y F9-PI) y controles.

#### 4.6.5 Inmunofenotipificación de células mononucleares de sangre periférica mediante citometría de flujo

Las CMSPh fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCanto II BD (*Becton Dickinson*) para la determinación de marcadores fenotípicos.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales BD: anti-CD45-PerCP-Cy5.5; anti-CD3-FITC, anti-CD4-APC, anti-CD8-PE, anti-CD16-Pacific Blue, anti-CD19-APC-Cy7 y anti-CD25-PE-Cy5. A los cultivos de CMSPh ( $1 \times 10^6$  células) tratadas y controles se agregaron 20  $\mu$ L de los anticuerpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45 y 5  $\mu$ L de anti-CD16 y anti-CD19, mientras que para la determinación de la subunidad alfa de la IL-2 se agregaron 5  $\mu$ L anti-CD3 y 5  $\mu$ L anti-CD25. Luego las células fueron incubadas durante 10-20 min a temperatura ambiente en oscuridad, lavadas con PBS, centrifugadas a 2000 rpm durante 5 min y resuspendidas en 500  $\mu$ L de PBS.

Para el análisis se adquirieron aproximadamente 100000 eventos en los tratamientos y controles y, se determinaron los porcentajes de cada población celular. La denominación de *bright* o *dim* se correlaciona con la expresión del número de marcadores de superficie que confieren propiedades funcionales únicas a las subpoblaciones (Farag & Caligiuri 2006).

La estrategia de análisis para las poblaciones celulares en CMSPh por citometría de flujo fue la siguiente: selección de singletes (*singlets*; células que pasan una sola vez por el laser y presentan la altura de señal (FSC-H) y el área de señal (FSC-A) uniforme que el citómetro registra como un evento), descartando agregados celulares (dos o más células). Dentro de los singletes se identifican las poblaciones de linfocitos y monocitos de acuerdo al tamaño (FSC) y complejidad interna (SSC). La población de monocitos se seleccionó considerando en primer lugar el FSC/SSC, CD45/FSC y posteriormente el CD4 y CD16. La población de células NK y NKT se determinaron en primer lugar mediante la expresión del marcador CD45/FSC en CMSPh y posteriormente por la presencia o ausencia de los marcadores CD3 coexpresado con CD16+. Las subpoblaciones de linfocitos T se analizaron mediante los marcadores CD45/FSC, CD3/FSC, CD4 y CD8.

Las células B se determinaron en base a los marcadores CD45/FSC, CD3 y CD19/FSC. Todos los marcadores se utilizaron tanto para los tratamientos como para los controles. El análisis de las células

mononucleares de sangre periférica humana tratadas con el extracto, fracciones de lectina y controles (PHA y medio RPMI) se realizó mediante el programa *FlowJo vX10*. Los resultados se expresaron mediante los valores relativos (% de células) y valores absolutos (células/ $\mu$ L). El número absoluto de cada población celular se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Células}/\mu\text{L} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células contadas}^{(a)}}{\text{N}^{\circ} \text{ de perlas contadas}^{(c)}} \times \frac{\text{concentración de las perlas}^{(b)}}{\text{volumen de muestra } (\mu\text{L})^{(d)}}$$

(a) Número de eventos celulares positivos.

(b) Número de eventos de perlas.

(c) Concentración de perlas: 46400 y 48100 (datos del producto BD tubos Trucount™)

(d) Volumen total de CMSPh en el momento de su obtención (150  $\mu$ L)

Durante el análisis, el número absoluto de células positivas en la muestra puede ser determinado comparando los eventos celulares con eventos de perlas.

#### 4.7 Análisis estadístico

Los resultados se analizaron empleando el programa GraphPad Prisma 5.0. Las diferencias entre el grupo control y los tratamientos se determinaron mediante análisis de la varianza (ANOVA). Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## **5. RESULTADOS**

### **5.1 Obtención del extracto crudo proteico de *Lupinus mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande**

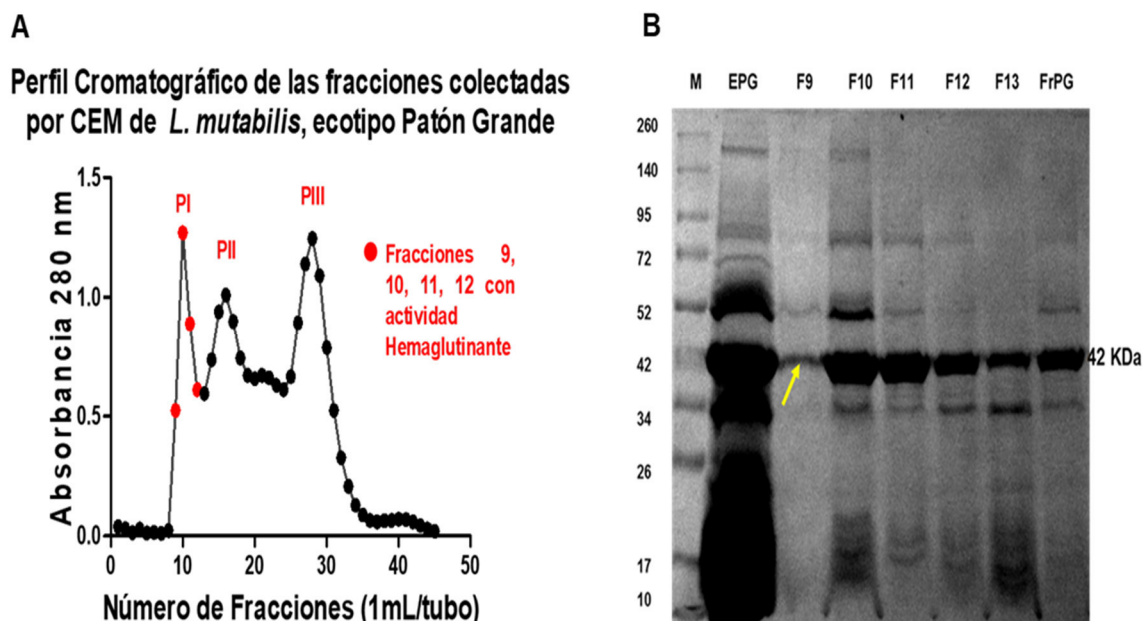
El volumen del extracto proteico obtenido fue de aproximadamente 12 mL, que corresponden a 24 mg/mL de proteína. El extracto presentó una coloración amarillenta.

### **5.2 Purificación del extracto crudo proteico de *Lupinus mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande (EPG)**

El fraccionamiento del extracto crudo proteico mediante cromatografía de exclusión molecular evidenció la presencia de tres picos que se denominaron: PI, PII y PIII (Figura 2A).

El perfil electroforético por SDS-PAGE en condiciones no reductoras permitió reconocer en el EPG 11 bandas, mientras que para el *pool* de fracciones (FrPG: F9, F10, F11, F12 y F13) del PI se observó la presencia de 4 bandas. Las fracciones mostraron una banda predominante que corresponde a una proteína de aproximadamente 42 KDa, mientras que en la F9-PI se observó la presencia dos bandas tenues y una banda definida que corresponde exclusivamente a la lectina de 42 KDa con propiedad hemaglutinante (Figura 2B). El extracto proteico (EPG) y la F9 del Pico I (F9-PI) se utilizaron para los ensayos de expresión génica transcripcional de inmunocitoquinas y para la inmunofenotipificación de poblaciones de células mononucleares humanas.

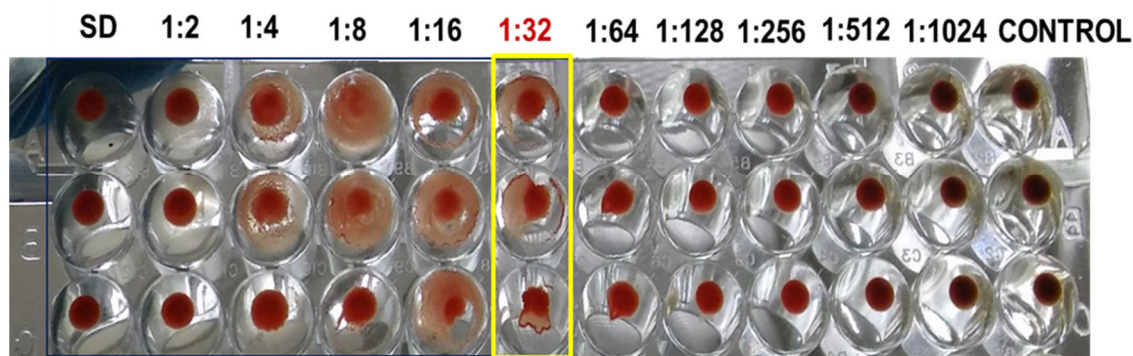




**Figura 2.** Perfil cromatográfico y SDS-PAGE del extracto proteico y fracciones de *L. mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande. **A)** Cromatografía de exclusión molecular (CEM) en Sephadex G-75. Se observa la presencia de tres picos (PI, PII y PIII). El número de fracciones colectadas fueron 45. **B)** SDS-PAGE del EPG y fracciones del pico I en condiciones no reductoras. En el pico I (PI) se observa la presencia de una banda de aproximadamente 42 KDa (la flecha amarilla señala la banda de 42 KDa). M: marcador de pesos moleculares, EPG: extracto proteico, F9: Fracción 9, F10: Fracción 10, F11: Fracción 11, F12: Fracción 12, F13: Fracción 13, FrPG: pool de fracciones 9, 10, 11, 12 y 13.

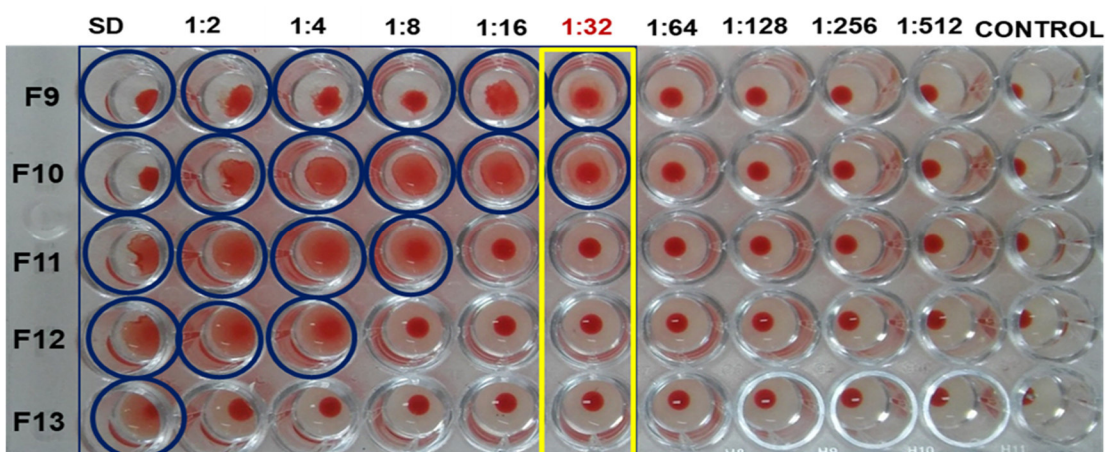
### 5.3 Evaluación de la actividad hemaglutinante del extracto proteico y las fracciones hemaglutinantes de *Lupinus mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande

Se determinó la actividad hemaglutinante (HA) en el extracto proteico hasta la dilución 1/32. Debido a una mayor concentración de la lectina en el extracto proteico sin diluir se observó un fenómeno comparable al “efecto de prozona” (Van Blitterswijk et al. 1976) (Figura 3).



**Figura 3.** Actividad hemaglutinante del extracto proteico de *L. mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande. Se observa la hemaglutinación (malla) de los glóbulos rojos de conejo al 2% tripsinizados hasta la dilución de 1:32. En el control se observó un botón (HA negativa). La prueba se realizó por triplicado. SD: extracto proteico sin diluir, HA: hemaglutinación.

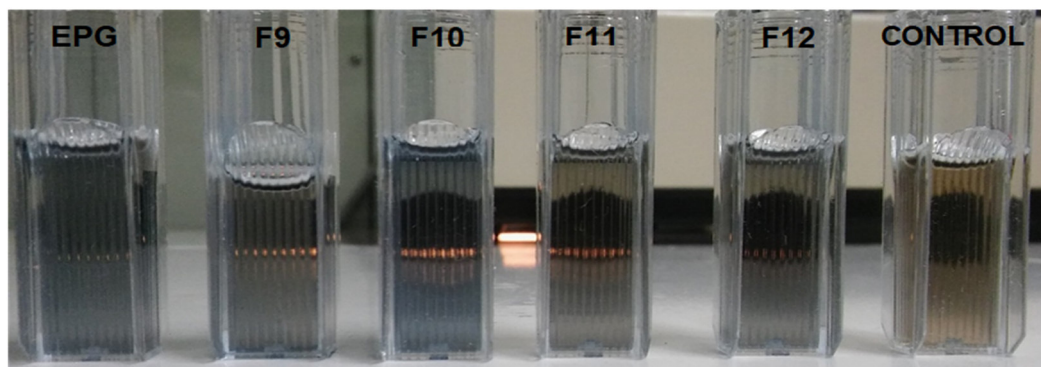
En la Figura 4 se observa la actividad hemaglutinante con las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular correspondiente al PI. Con las fracciones 9 y 10 se obtuvieron títulos de 32 mientras que con las fracciones 11 y 12 se observaron títulos de 8 y 4 respectivamente. La fracción 13 sin diluir presentó actividad hemaglutinante.



**Figura 4.** Actividad hemaglutinante de las fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular. Las fracciones (F): F9, F10, F11, F12 y F13 presentaron actividad hemaglutinante hasta la dilución 1:32, 1:32, 1:8, 1:4 y SD respectivamente. En el control se observó un botón (HA negativa). SD: fracción sin diluir.

#### 5.4 Determinación de la concentración de proteínas del extracto crudo proteico y fracciones de *L. mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande

El rango de concentración de proteínas en el extracto proteico de tarwi fue de 12-24 mg/mL. En el caso de las fracciones obtenidas por exclusión molecular fueron: F9 (0.85 mg/mL), F10 (2.02 mg/mL), F11 (1.82 mg/mL) y F12 (0.89 mg/mL) (Figura 5). Las concentraciones proteicas por absorbancia a luz UV fueron concordantes con las obtenidas por el método de Bradford.



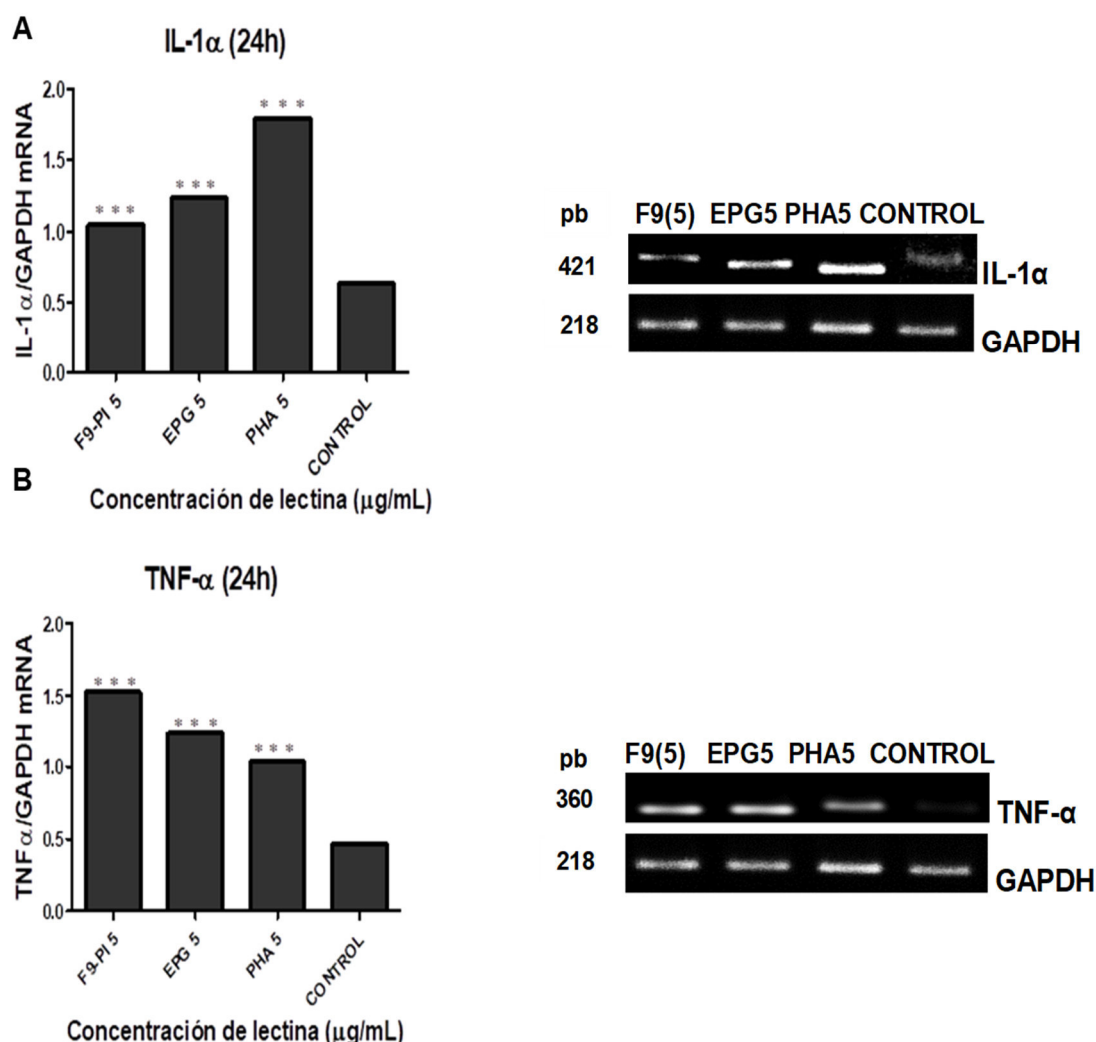
**Figura 5. Concentración de proteínas del extracto crudo proteico y fracciones de *L. mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande.** El EPG y las fracciones fueron cuantificados mediante el método de Bradford. EPG: extracto proteico, F: fracciones obtenidas por cromatografía de exclusión molecular.

#### 5.5 Expresión transcripcional para citoquinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10 y TGF- $\beta$

##### 5.5.1 Determinación de la expresión mRNA para citoquinas IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$

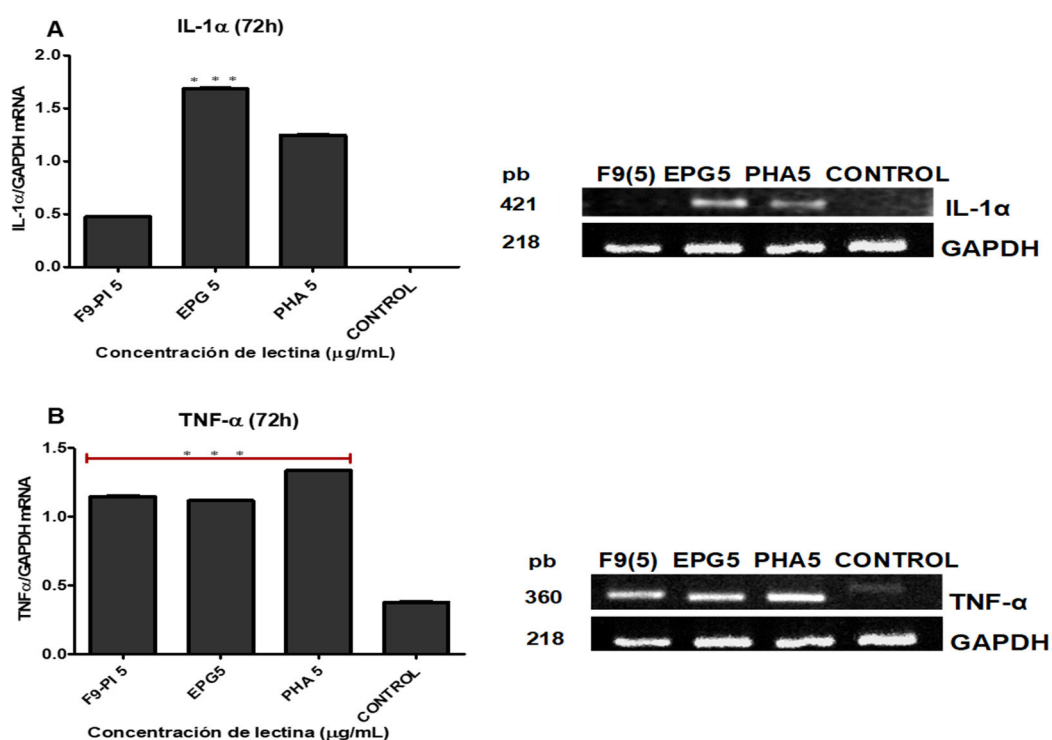
En la Figura 6A se observa que el cultivo de CMSPH tratado durante 24 h con el EPG 5  $\mu$ g/mL y la F9-PI 5  $\mu$ g/mL incrementó la expresión de la IL-1 $\alpha$  y el TNF- $\alpha$  mRNA con relación al control ( $p < 0.05$ ), sin embargo al comparar la expresión de la IL-1 $\alpha$  con respecto a la PHA 5  $\mu$ g/mL no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ). El EPG 5  $\mu$ g/mL estimulo una mayor expresión de la IL-1 $\alpha$  mRNA pero una disminución de la expresión del TNF- $\alpha$  mRNA con relación a la F9-PI 5  $\mu$ g/mL ( $p < 0.05$ ). La expresión del TNF- $\alpha$  mRNA se incrementó en células

tratadas con la F9-PI 5  $\mu\text{g/mL}$  respecto a la PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0.05$ ). La PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  presentó un incremento en la expresión de la IL-1 $\alpha$  mRNA respecto a la expresión del TNF- $\alpha$  mRNA (Figura 6 A y B y Tabla 4).



**Figura 6.** Expresión del gen de la IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  estimulada con la F9-PI de *L. mutabilis*, ecotipo Patón Grande durante 24 horas. La expresión del gen de la IL-1 $\alpha$  y el TNF- $\alpha$  a nivel transcripcional fue determinada mediante la PCR convencional en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con la F9-PI, EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 24 h. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Cada banda fue cuantificada por densitometría empleando el programa ImageJ (NIH, USA). La expresión del gen de la IL-1 $\alpha$  (**A**) y el TNF- $\alpha$  (**B**) fueron normalizados con los niveles de expresión del GAPDH mRNA. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, PHA: Fitohemaglutinina, CMSPH: células mononucleares de sangre periférica, IL: interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral. GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. \* $p < 0.05$ .

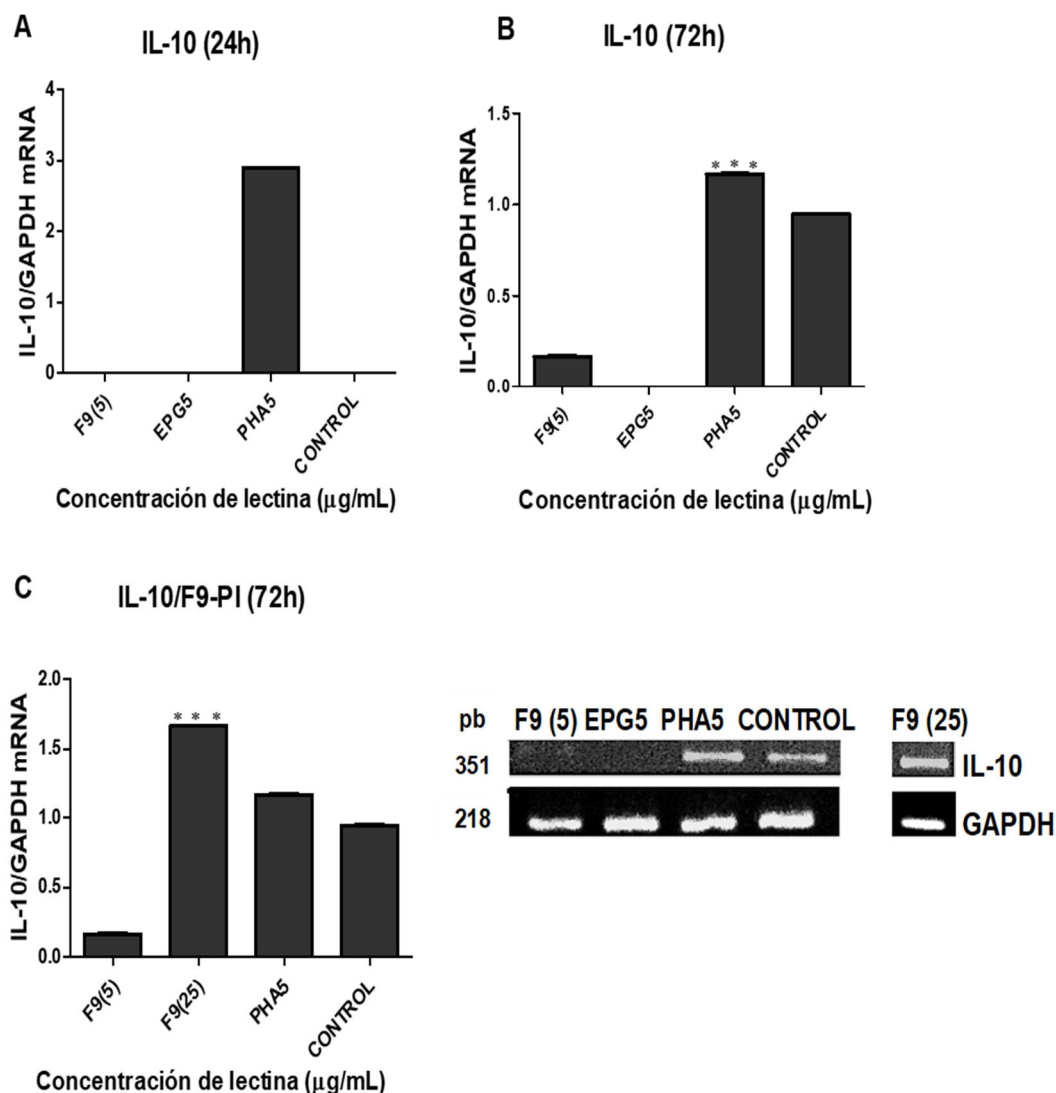
A las 72 h se observó un incremento de la expresión de la IL-1 $\alpha$  y del TNF- $\alpha$  mRNA en las células mononucleares tratadas con la F9-PI 5  $\mu$ g/mL con respecto al control ( $p < 0.05$ ), sin embargo cuando se comparó con la PHA 5  $\mu$ g/mL no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) (Figura 7 A y B). La expresión de la IL-1 $\alpha$  y del TNF- $\alpha$  mRNA en cultivos tratados con el EPG 5  $\mu$ g/mL se incrementó con respecto al control ( $p < 0.05$ ), sin embargo sólo la expresión de la IL-1 $\alpha$  mRNA se incrementó significativamente con relación a la PHA 5  $\mu$ g/mL ( $p < 0.05$ ) (Figura 7 A y B y Tabla 4).



**Figura 7.** Expresión del gen de la IL-1 $\alpha$  y el TNF- $\alpha$  inducida con la F9-PI de *L. mutabilis*, ecotipo Patón Grande durante 72 horas. La expresión del gen de la IL-1 $\alpha$  y el TNF- $\alpha$  a nivel transcripcional fue determinada mediante la PCR convencional en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con la F9-PI, EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 72 h. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Cada banda fue cuantificada por densitometría empleando el programa ImageJ (NIH, USA). La expresión del gen IL-1 $\alpha$  **(A)** TNF- $\alpha$  **(B)** fueron normalizados con los niveles de expresión del GAPDH mRNA. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, PHA: Fitohemaglutinina, CMSPh: células mononucleares de sangre periférica, IL: interleuquina, TNF: factor de necrosis tumoral. GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. \* $p < 0.05$ .



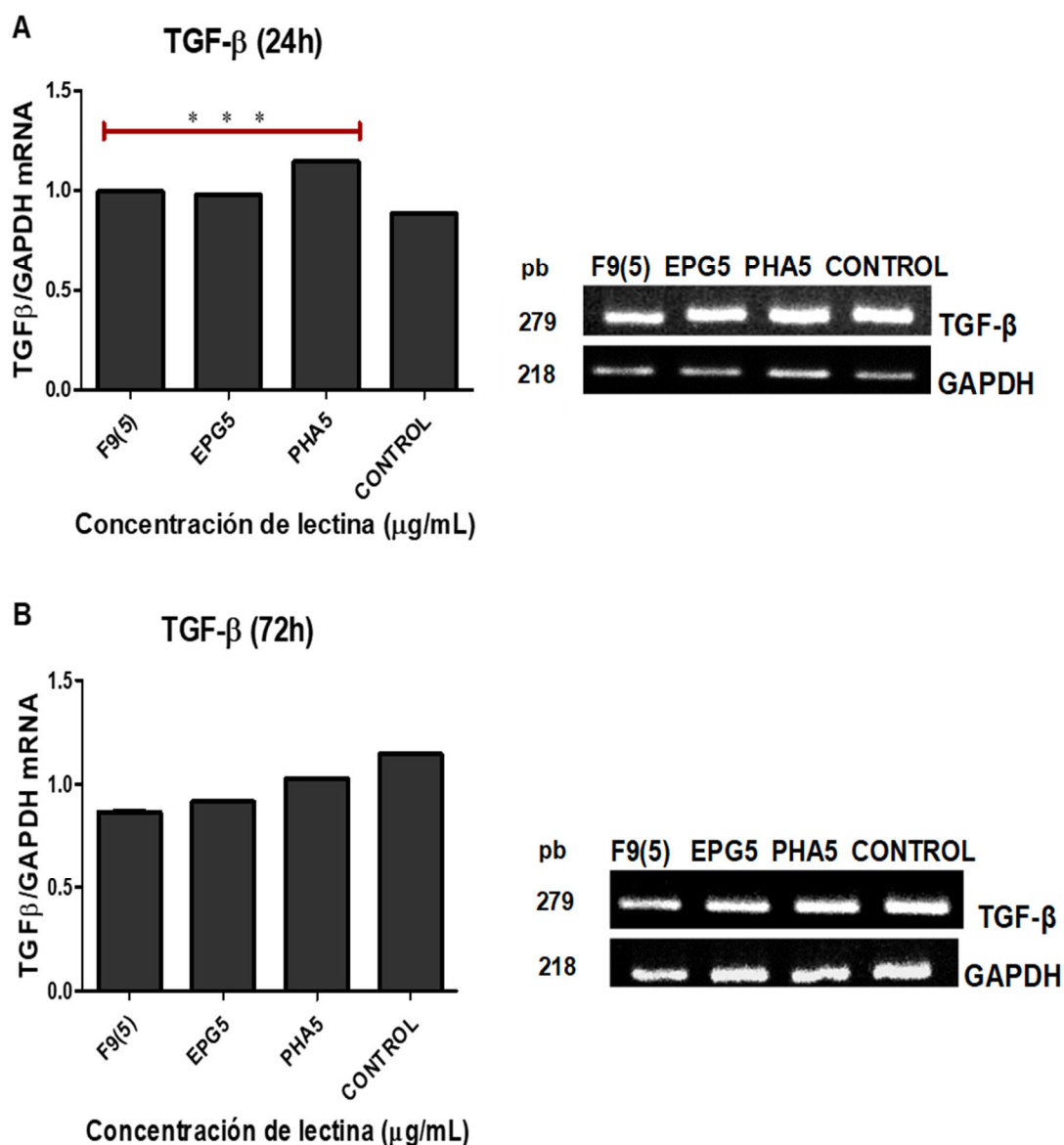
### 5.5.2 Determinación de la expresión mRNA para citoquinas IL-10 y TGF- $\beta$



**Figura 8.** Efecto de la F9-PI de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande sobre la expresión génica de la IL-10 durante 24 y 72 horas. La expresión del gen de la IL-10 a nivel transcripcional fue determinada mediante la PCR convencional en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con la F9-PI, EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 24 y 72 h. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Cada banda fue cuantificada por densitometría empleando el programa ImageJ (NIH, USA). La expresión del gen de la IL-10 fue normalizado con los niveles de expresión del GAPDH mRNA. **A-B.** Expresión de la IL-10 mRNA luego de 24 y 72 h de tratamiento. **C.** Expresión génica de la IL-10 estimulada con 5 y 25  $\mu\text{g/mL}$  de la F9-PI. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, PHA: Fitohemaglutinina, CMSPh: células mononucleares de sangre periférica, IL: interleuquina, GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. \* $p < 0.05$ .

No se observó la expresión de la IL-10 mRNA en las células mononucleares tratadas durante 24 h con la fracción, el extracto proteico y el control (Figura 8A y Tabla 4). La PHA 5 µg/mL indujo la expresión de la IL-10 mRNA durante 24 y 72 h de incubación (Figura 8A y 8B). A las 72 h de tratamiento se estimuló la expresión de la IL-10 mRNA con la F9-PI 5 µg/mL sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a la PHA 5 µg/mL y el control ( $p>0.05$ ) (Figura 8B y Tabla 4). No se detectó la expresión de la IL-10 mRNA luego de 24 y 72 h de tratamiento con el EPG 5 µg/mL (Figura 8A y 8B). Cuando se probó la concentración de la F9-PI 25 µg/mL se observó el incremento de la expresión de la IL-10 mRNA con diferencias estadísticamente significativas con respecto al control, la F9-PI 5 µg/mL y la PHA 5 µg/mL ( $p<0.05$ ) (Figura 8C y Tabla 4).

En la Figura 9A se observó la expresión del TGF- $\beta$  mRNA en células mononucleares tratadas con la F9-PI, EPG, PHA y el control luego de 24 h de incubación. Los tratamientos (F9-PI, EPG) y la PHA mostraron diferencias significativas en la expresión transcripcional del gen cuando se comparó con el control ( $p<0.05$ ), sin embargo cuando se relacionó los tratamientos con la PHA no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p>0.05$ ) (Figura 9A y Tabla 4). La expresión transcripcional del gen del TGF- $\beta$  disminuyó luego de 72 h de tratamiento con el extracto, fracción y la PHA, con respecto al control, sin embargo los tratamientos no presentaron diferencias significativas en su expresión de la inmunocitoquina con relación a la PHA (Figura 9B y Tabla 4).

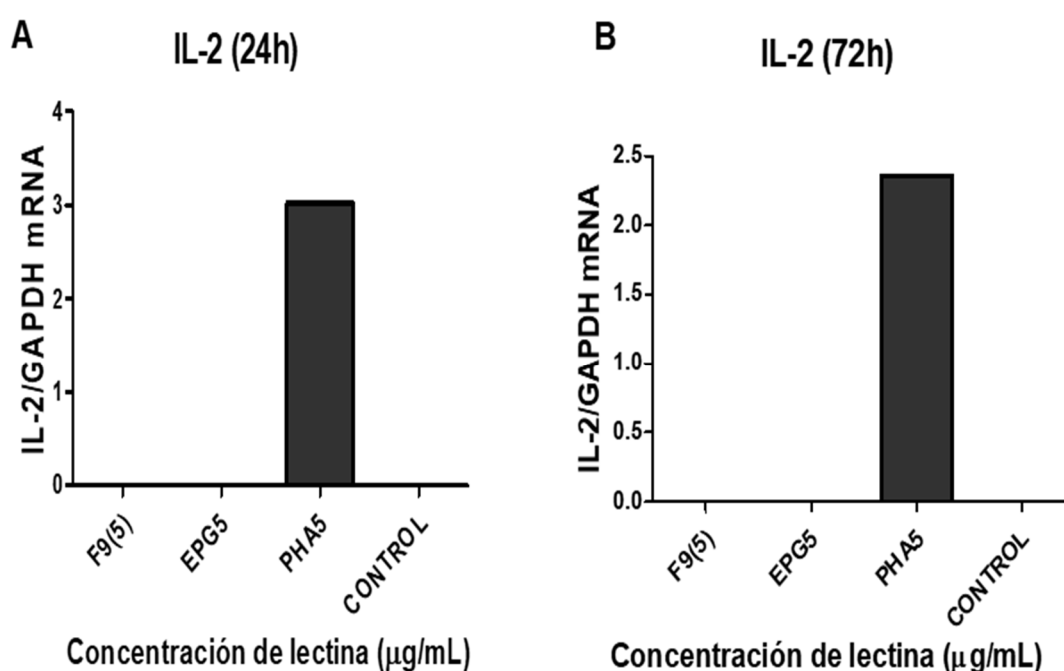


**Figura 9.** Efecto de la F9-PI de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande sobre la expresión génica del TGF- $\beta$  durante 24 y 72 horas. La expresión del gen del TGF- $\beta$  a nivel transcripcional fue determinada mediante la PCR convencional en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con F9-PI, EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 24 y 72 h. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Cada banda fue cuantificada por densitometría empleando el programa ImageJ (NIH, USA). **A-B.** Expresión de IL-10 mRNA normalizados con los niveles de expresión del GAPDH mRNA. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, PHA: Fitohemaglutinina, CMSPH: células mononucleares de sangre periférica, IL: interleuquina, TGF: Factor de crecimiento transformante, GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa. \* $p < 0.05$ .



### 5.5.3 Determinación de la expresión mRNA para citoquinas IL-2 e IFN- $\gamma$

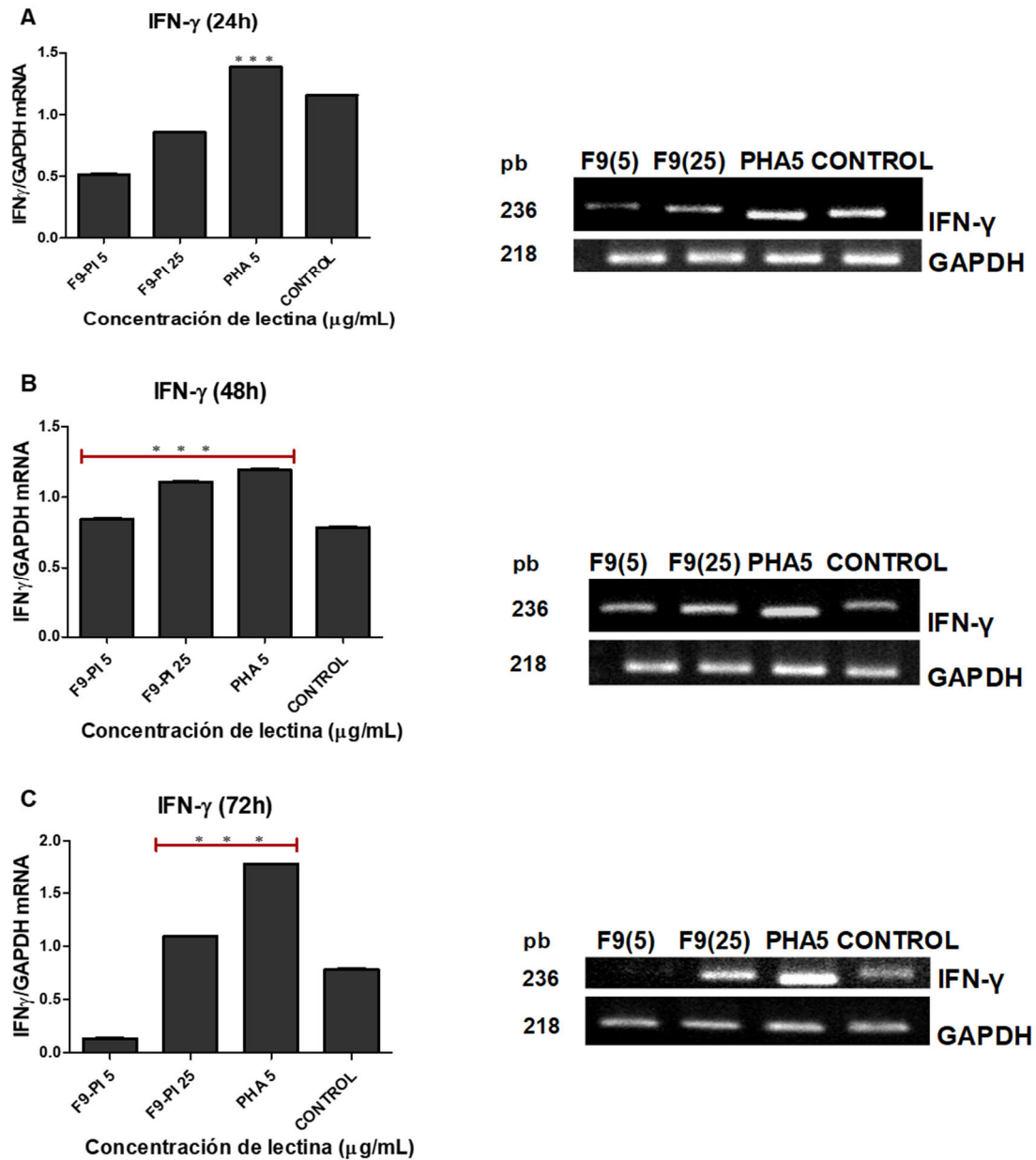
No se detectó la expresión de la IL-2 mRNA en los tratamientos con la fracción, el extracto proteico y el control en ninguno de los tiempos evaluados. La PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  incrementó considerablemente la expresión del gen de la IL-2 mRNA luego de 24 y 72 h de tratamiento (Figura 10 A y B y Tabla 4).



**Figura 10.** Análisis de la expresión génica de la IL-2 en células mononucleares humana estimulada con la F9-PI de *L. mutabilis*, ecotipo Patón Grande durante 24 y 72 horas. La expresión del gen de la IL-2 a nivel transcripcional fue determinada mediante la PCR convencional en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con F9-PI, EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 24 y 72 h. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Cada banda fue cuantificada por densitometría empleando el programa ImageJ (NIH, USA). **A-B.** Expresión de IL-2 mRNA normalizados con los niveles de expresión de GAPDH mRNA. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, PHA: Fitohemaglutinina, CMSPH: células mononucleares de sangre periférica, IL: interleuquina, GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. \* $p < 0.05$ .

En la Figura 11 se grafica la expresión del IFN- $\gamma$  mRNA en células mononucleares tratadas a concentraciones F9-PI (5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ) durante 24 h, pero sin diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ( $p>0.05$ ) (Figura 11A). La F9-PI (5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ) a las 48 h aumentó significativamente el nivel de expresión del IFN- $\gamma$  mRNA con relación al control ( $p<0.05$ ) (Figura 11B). A las 72 h de incubación la expresión IFN- $\gamma$  mRNA disminuyó considerablemente con el tratamiento F9-PI 5  $\mu\text{g/mL}$  ( $p>0.05$ ), mientras que con la F9-PI 25  $\mu\text{g/mL}$  se indujo el incremento de la expresión transcripcional del gen con respecto al control ( $p<0.05$ ) (Figura 11C). En todos los tiempos evaluados las dos concentraciones de la F9-PI no presentaron resultados estadísticamente significativos con relación a PHA ( $p>0.05$ ) (Figura 11 A, B y C y Tabla 4).

El gen de referencia GAPDH fue detectado en CMSPH tratadas y no tratadas. El gen GAPDH mostró un nivel de expresión constante en cultivo de CMSPH durante 24, 48 y 72 h.



**Figura 11.** Análisis de la expresión génica del IFN- $\gamma$  en células mononucleares humanas inducida con la F9-PI de *L. mutabilis*, ecotipo Patón Grande durante 24, 48 y 72 horas. La expresión génica del IFN- $\gamma$  a nivel transcripcional fue determinada mediante la PCR convencional en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con la F9-PI, EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 24, 48 y 72 h. Los productos de la PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5 %. Cada banda fue cuantificada por densitometría empleando el programa ImageJ (NIH, USA). **A-C.** Expresión de la IL-2 mRNA normalizados con los niveles de expresión del GAPDH mRNA. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, PHA: Fitohemaglutinina, CMSPh: células mononucleares de sangre periférica, IFN: interferón, GAPDH: gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa. \* $p < 0.05$ .

**Tabla 4.** Resultados de la densidad de señal de la expresión de mRNA de inmunocitoquinas normalizadas con la señal del control (GAPDH mRNA) mediante el programa ImageJ (NIH, USA)

EXTRACTO/FRACCIÓN <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet	EXPRESIÓN CITOQUINAS	24 h		72 h	
		CONTROLES		CONTROLES	
		RPMI (N)	PHA (P)	RPMI (N)	PHA (P)
F9-PI 5 µg/mL	IL-1α	I	I	I	D
	TNF-α	I	I	I	D
	IL-10	ND	ND	D	D
	TGF-β	I	D	D	D
	IL-2	ND	ND	ND	ND
	IFN-γ	D	D	D	D
F9-PI 25 µg/mL	IL-1α	NR	NR	NR	NR
	TNF-α	NR	NR	NR	NR
	IL-10	NR	NR	I	I
	TGF-β	NR	NR	NR	NR
	IL-2	NR	NR	NR	NR
	IFN-γ	D	D	I	D
EPG 5 µg/mL	IL-1α	I	I	I	I
	TNF-α	I	I	I	D
	IL-10	ND	ND	ND	ND
	TGF-β	I	D	D	D
	IL-2	ND	ND	ND	ND
	IFN-γ	ND	ND	ND	ND

I: Incrementa                      D: Disminuye  
 ND: No Detectado                NR: No Realizado

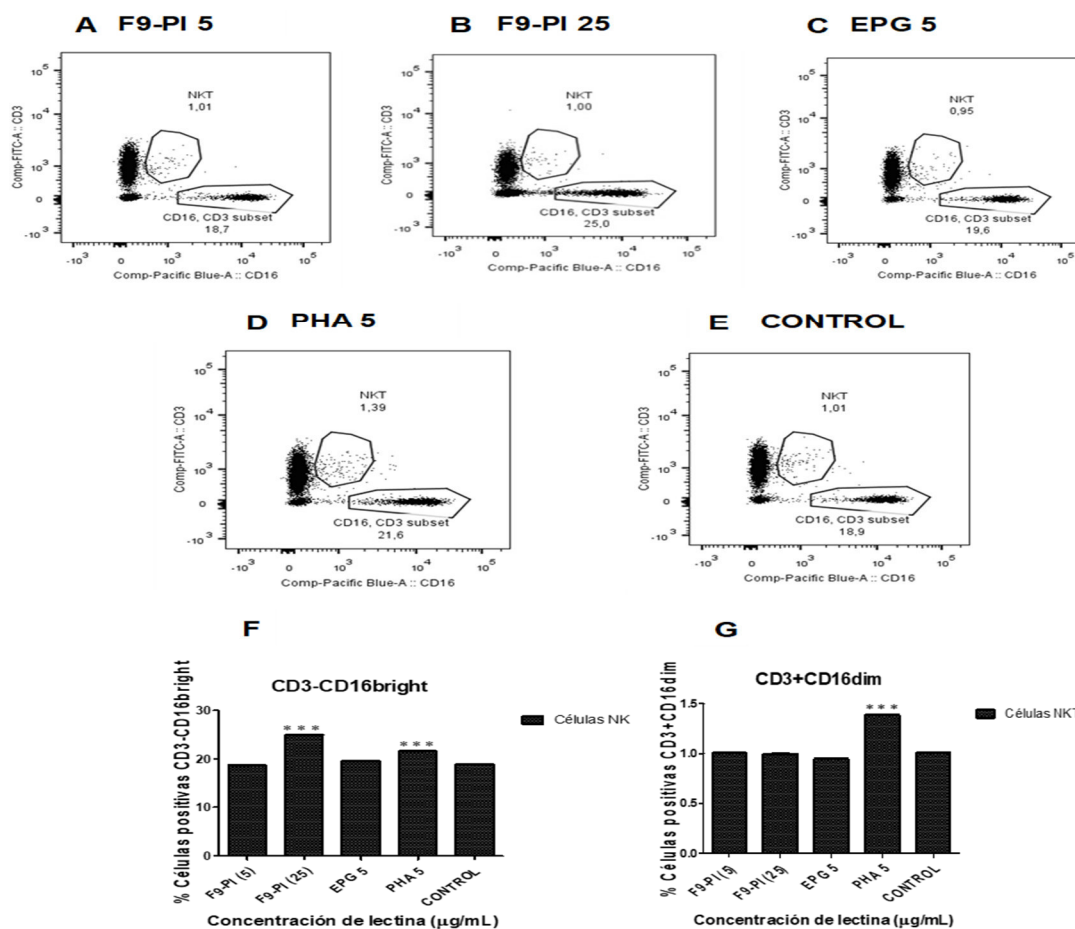
## Inmunofenotipificación de células mononucleares de sangre periférica mediante Citometría de Flujo

### 5.6.1 Fenotipificación de poblaciones celulares de la inmunidad innata

En la Figura 12 se evidencia el porcentaje de células NK determinado por el panel CD3-CD16<sup>bright</sup> (Figura 12 A-E). El porcentaje de células para F9-PI (5 y 25 µg/mL), EPG 5 µg/mL, PHA 5 µg/mL y control correspondieron a 18.7, 25, 19.6, 21.6 y 18.9 respectivamente. Los porcentajes de células mononucleares obtenidos mediante el tratamiento con el EPG 5 µg/mL, F9-PI 25 µg/mL y PHA 5 µg/mL fueron estadísticamente significativos con relación al control ( $p < 0.05$ ). Además, se observó un mayor porcentaje de células NK con el tratamiento F9-PI 25 µg/mL con respecto a PHA ( $p < 0.05$ ) (Figura 12F).

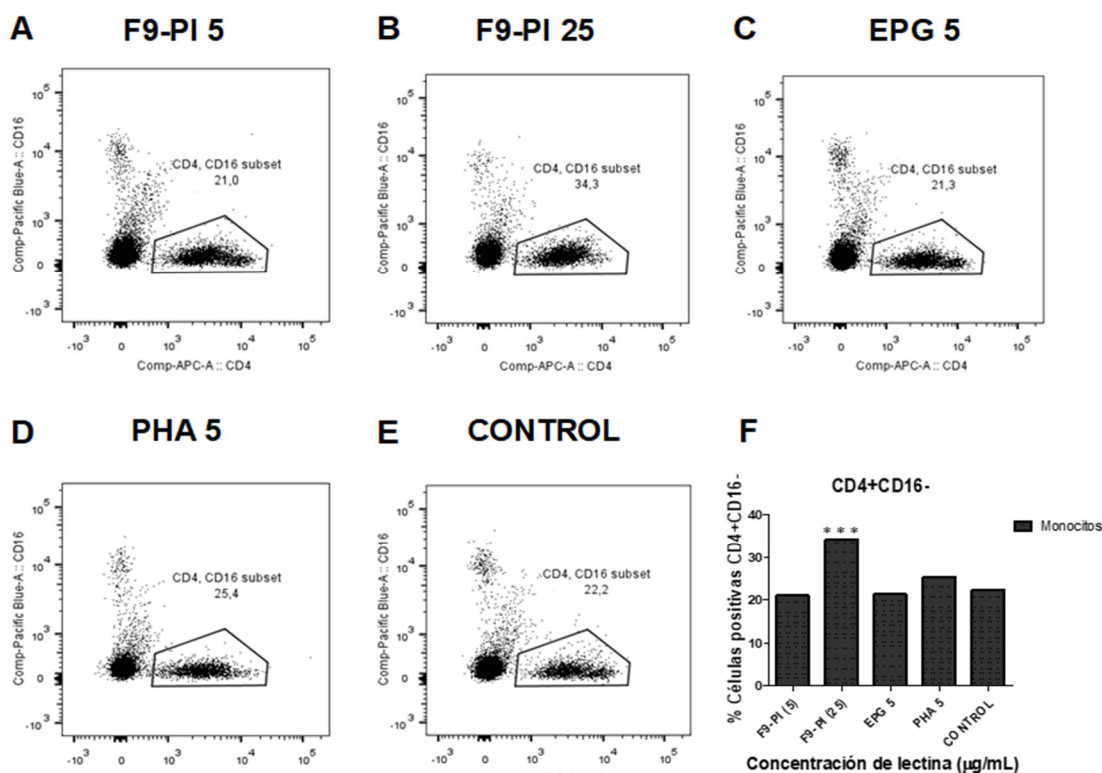
El análisis de las células NKT se realizó del mismo modo que para las células NK, pero considerando la población de células mononucleares que presentan los marcadores CD3+CD16<sup>dim</sup> tanto para los tratamientos como para los controles (Figura 12 A-E). El porcentaje de células CD3+CD16<sup>dim</sup>

(NKT) para la F9-PI (5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ), EPG 5  $\mu\text{g/mL}$ , PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  y control fueron 1.01, 1, 0.95, 1.39 y 1.01 respectivamente. La PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  presentó porcentaje de células NKT estadísticamente significativo con relación al control ( $p < 0.05$ ) (Figura 12G).



**Figura 12.** Identificación de las poblaciones celulares CD3-CD16<sup>bright</sup> (NK) y CD3+CD16<sup>dim</sup> (NKT) estimulada con la F9-PI de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande. El porcentaje relativo de células CD3-CD16<sup>bright</sup> (NK) y CD3+CD16<sup>dim</sup> (NKT) se determinó mediante citometría en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con F9-PI (5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ), EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 72 h. **A-E:** Dot plot representativo de las poblaciones celulares seleccionadas mediante CD3-CD16<sup>bright</sup> y CD3+CD16<sup>dim</sup> a partir de las características de complejidad (*side scatter*) y tamaño (*forward scatter*) y CD45+. **F-G** Gráfico del porcentaje del fenotipo de células NK y NKT estimuladas con los tratamientos y controles. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, CD: *cluster designation*, PHA: Fitohemaglutinina, CMSPh: células mononucleares de sangre periférica. Los resultados representan la media y desviación estándar de los experimentos por triplicado. \*  $p < 0.05$ .

El porcentaje de monocitos para la F9-PI (5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ), EPG 5  $\mu\text{g/mL}$ , PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  y el control fue 21.0, 34.3, 21.3, 25.4 y 22.2 respectivamente (Figura 13 A-E). El tratamiento de las CMSPh con la F9-PI 25  $\mu\text{g/mL}$  y la PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  presentaron porcentajes de monocitos estadísticamente significativos con relación al control ( $p < 0.05$ ). Los cultivos tratados con la F9-PI 25  $\mu\text{g/mL}$  mostraron diferencias significativas en la población monocítica con relación a la PHA y el control ( $p < 0.05$ ) (Figura 13F).

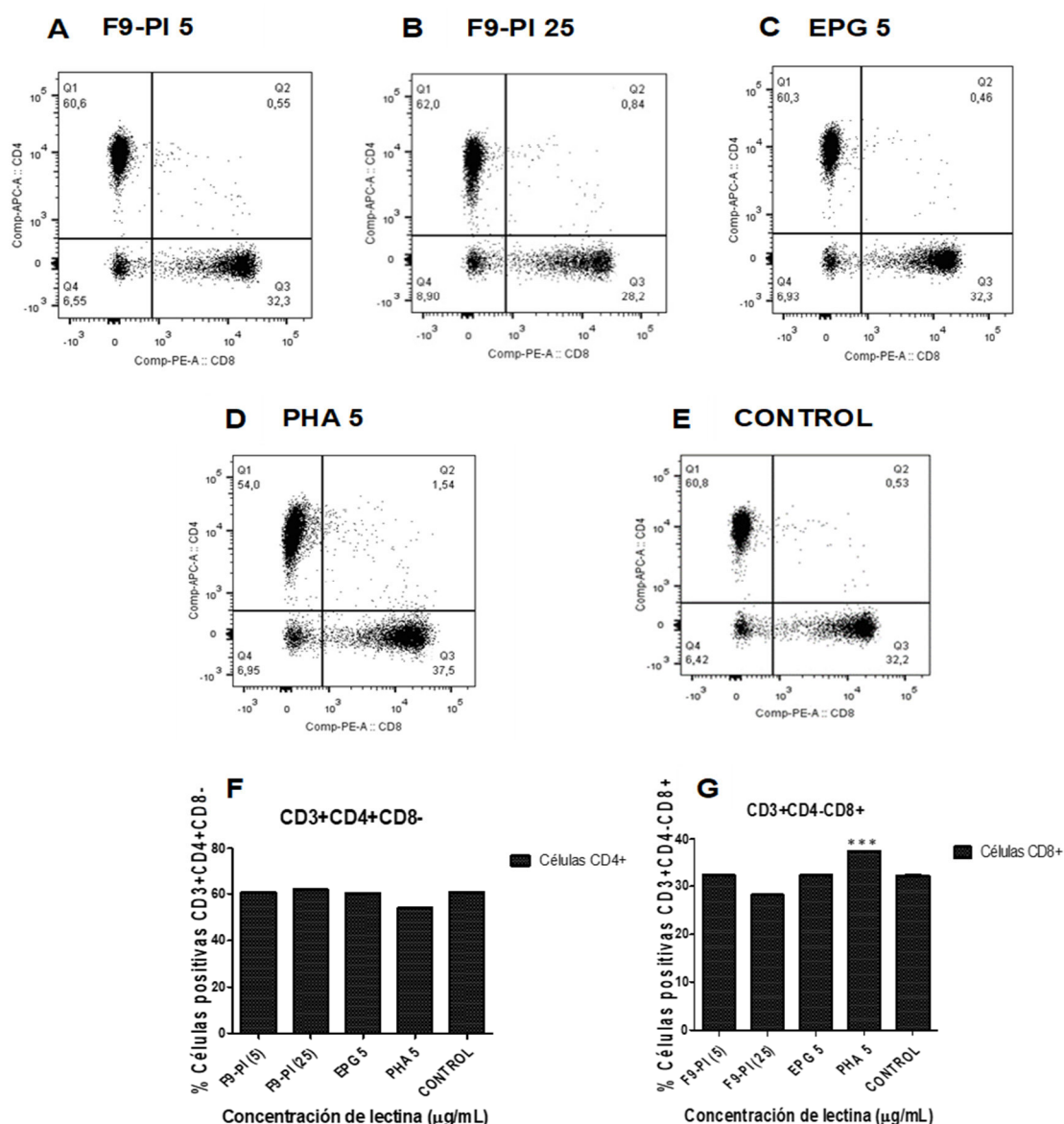


**Figura 13.** Análisis de la línea monocítica CD45+CD4+CD16- estimulada con la F9-PI de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande. El porcentaje de monocitos CD4+CD16- se determinó mediante citometría en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con la F9-PI (5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ), EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 72 h. **A-E:** Dot plot representativo de las poblaciones celulares seleccionadas mediante CD4+CD16- a partir de las características de complejidad (*side scatter*) y tamaño (*forward scatter*) y CD45+. **F.** Gráfico del porcentaje del fenotipo de monocitos estimulados con los tratamientos y controles. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, CD: *cluster designation*, PHA: Fitohemaglutinina, CMSPh: células mononucleares de sangre periférica. Los resultados representan la media y desviación estándar de los experimentos por triplicado. \*  $p < 0.05$ .

## **5.6.2 Fenotipificación de poblaciones celulares de la inmunidad adaptativa**

### **5.6.2.1 Inmunofenotipificación de subpoblaciones de linfocitos T**

Las subpoblaciones de células T fueron determinadas considerando los marcadores CD45, CD3, CD4 y CD8. El porcentaje de las subpoblaciones de células T se seleccionaron mediante el panel de marcadores CD4+CD8- (Q1), CD4+CD8+ (Q2), CD4-CD8- (Q3) y CD4-CD8+ (Q4) para los tratamientos y controles (Figura 14 A-E). La población de células CD4-CD8- presentaron valores porcentuales entre 6.42-6.95 para los controles y tratamientos. Sin embargo la F9-PI 25 µg/mL presentó un valor porcentual de 8.9. La células CD4+CD8+ presentaron valores porcentuales entre 0.46-0.84 para el control negativo y tratamientos, mientras que la PHA 5 µg/mL presentó un valor porcentual de 1.54. La relación entre células CD4+ y CD8+ mostró un rango entre 1.4-2.2 (Anexo 6). El porcentaje de células CD4+CD8- para la F9-PI (5 y 25 µg/mL), EPG 5 µg/mL, PHA 5 µg/mL y control fueron 54, 60.8, 60.3, 62, y 60.6 respectivamente, mientras que el porcentaje de células CD4-CD8+ para la F9-PI (5 y 25 µg/mL), EPG 5 µg/mL, PHA 5 µg/mL y control fueron 32.3, 28.2, 32.3, 37.5 y 32.2 respectivamente (Figura 14 A-E). La F9-PI 25 µg/mL no presentó diferencias significativas en el porcentaje de células CD4+CD8- con relación al control ( $p>0.05$ ) (Figura 14F), mientras que la PHA 5 µg/mL mostró diferencias significativas en el porcentaje de células CD4-CD8+ con respecto al control y tratamientos ( $p<0.05$ ) (Figura 14G).

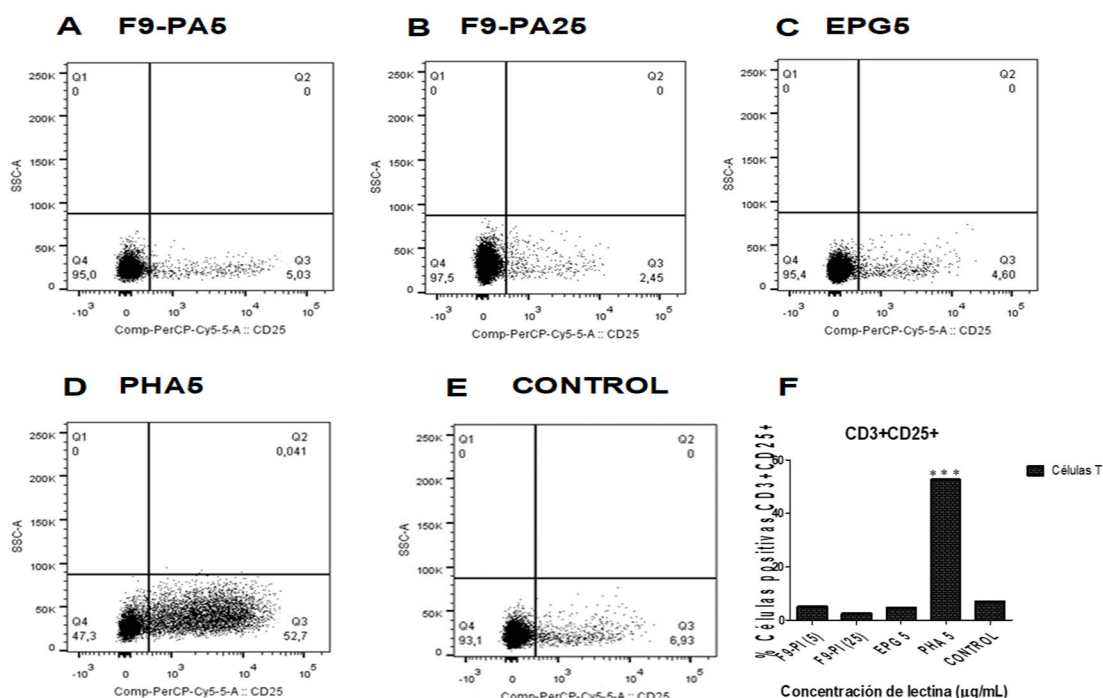


**Figura 14.** Identificación de las poblaciones celulares CD4+CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8- y CD4-CD8+ estimulada con la F9-PI de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande. El porcentaje de células CD4+CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8- y CD4-CD8+ se determinó mediante citometría en células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con F9-PI (5 y 25 µg/mL), EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 72 h. **A-E:** Dot plot representativo de las poblaciones celulares seleccionadas mediante CD45+, CD3+, CD4+ y CD8+ a partir de las características de complejidad (*side scatter*) y tamaño (*forward scatter*). **F-G** Gráfico del porcentaje del fenotipo de células T CD3+CD4+CD8- y CD3+CD4-CD8+ estimuladas con los tratamientos y controles. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, CD: *cluster designation*, PHA: Fitoheماغlutinina, CMSPh: células mononucleares de sangre periférica, Q1: CD4+CD8-, Q2: CD4+CD8+, Q3: CD4-CD8-, Q4: CD4-CD8+. Los resultados representan la media y desviación estándar de los experimentos por triplicado. \* p< 0.05.



### 5.6.2.2 Inmunofenotipificación del receptor CD25 en células mononucleares de sangre periférica humana

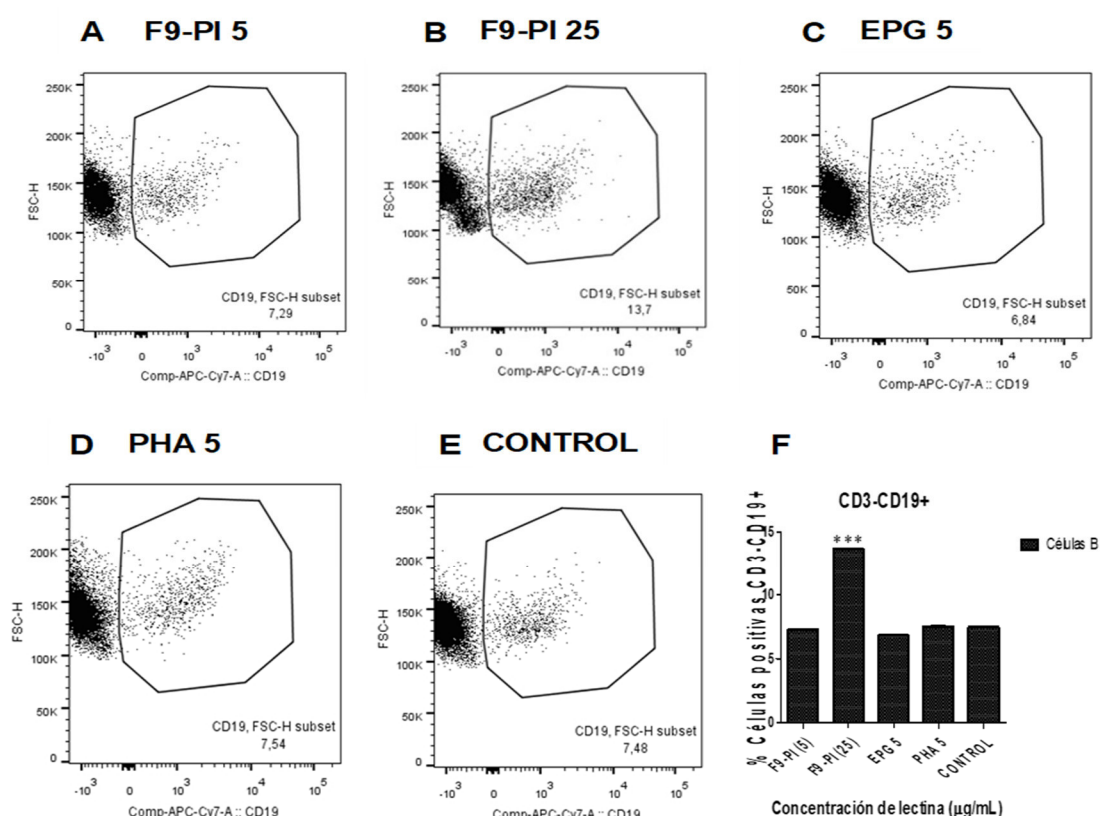
Las células mononucleares que presentaron el receptor CD25 fueron seleccionadas en base al marcador CD3 y CD25. El porcentaje de células positivas CD25 para la F9-PI (5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ), EPG 5  $\mu\text{g/mL}$ , PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  y control fueron 5.03, 2.45, 4.6, 52.7 y 6.93 respectivamente (Figura 15 A-E). El extracto y las fracciones no mostraron diferencias significativas ( $p>0.05$ ), mientras que la PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  mostró un incremento estadísticamente significativo cuando se comparó con los tratamientos y el control ( $p<0.05$ ) (Figura 15F).



**Figura 15.** Análisis de los linfocitos CD3+CD25+ estimulados con la F9-PI de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande. El porcentaje de linfocitos CD3+CD25+ se determinó mediante citometría en células mononucleares de sangre periférica humana estimulada con la F9-PI (5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ), EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 72 h. **A-E:** Dot plot representativo de las poblaciones celulares seleccionadas mediante CD3+, CD25+ a partir de las características de complejidad (*side scatter*) y tamaño (*forward scatter*). **F.** Gráfico del porcentaje del fenotipo de células T CD3+CD25+ estimuladas con los tratamientos y controles. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, CD: *cluster designation*, PHA: Fitohemaglutinina, CMSPh: células mononucleares de sangre periférica, Los resultados representan la media y desviación estándar de los experimentos por triplicado. \*  $p<0.05$ .

### 5.6.2.3 Inmunofenotipificación de linfocitos CD3-CD19+

El porcentaje de células B se determinó por el panel CD3- y CD19+ tanto para los tratamientos como los controles (Figura 16 A-E). Los resultados porcentuales de células B para la F9-PI (5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ), EPG 5  $\mu\text{g/mL}$ , PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  y control fueron 7.29, 13.7, 6.84, 7.54 y 7.48 respectivamente. Las células B tratadas con la F9-PI 25  $\mu\text{g/mL}$  mostraron diferencias significativas con respecto al control y la PHA ( $p < 0.05$ ) (Figura 16F).



**Figura 16.** Análisis inmunofenotípico de las células CD3-CD19+ estimulada con la F9-PI de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande. El porcentaje de linfocitos CD3-CD19+ se determinó mediante citometría en células mononucleares de sangre periférica humana estimulada con la F9-PI (5 y 25  $\mu\text{g/mL}$ ), EPG, PHA (control positivo) y medio RPMI (control negativo) durante 72 h. **A-E:** Dot plot representativo de las poblaciones celulares seleccionadas mediante CD3+, CD19+ a partir de las características de complejidad (*side scatter*) y tamaño (*forward scatter*). **F.** Gráfico del porcentaje del fenotipo de células B CD3+CD19+ estimuladas con los tratamientos y controles. EPG: extracto proteico de Patón Grande, F9-PI: fracción 9 obtenida por cromatografía de exclusión molecular – pico I, CD: *cluster designation*, PHA: Fitohemaglutinina, CMSPh: células mononucleares de sangre periférica, Los resultados representan la media y desviación estándar de los experimentos por triplicado. \*  $p < 0.05$ .

### **5.6.3 Conteos totales u absolutos de las poblaciones de células mononucleares de sangre periférica humana**

En la tabla 5 se observó que las CMSPH tratadas con el EPG 5 µg/mL disminuyeron en el número total (absoluto) de células NKT, CD4+CD8+ y monocitos, mientras que se observó un incremento no significativo en el conteo total de linfocitos NK y CD4-CD8- con respecto al control y PHA ( $p>0.05$ ). El conteo total se incrementó en células CD4+CD8-, CD4-CD8+ y LB con respecto a PHA, mientras que se observó una disminución de las mismas poblaciones cuando se comparó con el control ( $p>0.05$ ). La fracción F9-PI 5 µg/mL incrementó el número total de linfocitos CD4-CD8+ y CD4-CD8-, mientras que disminuyó el conteo total de células NKT y monocitos con respecto al control y PHA ( $p>0.05$ ), sin embargo se observó un incremento de las poblaciones NK, CD4+CD8- y LB en comparación a PHA, mientras que disminuyó el número total de células NK y B con respecto al control. Además, no se observaron diferencias en el número total de linfocitos CD4+CD8- cuando se comparó con el control. La fracción F9-PI 25 µg/mL disminuyó en 50% en el número total de linfocitos NKT y subpoblaciones T con relación al control y PHA. Sin embargo la población de monocitos se incrementó tres veces más que el control y PHA ( $p<0.05$ ). La población de linfocitos NK y B disminuyeron con relación al control, mientras que se observó un incremento en el número de los linfocitos B con respecto a PHA. Cabe resaltar que a pesar que la PHA 5 µg/mL no indujo un efecto mitogénico sobre las poblaciones celulares, se observó un incremento significativo en el conteo total de linfocitos CD4+CD8+ con respecto al control y PHA ( $p<0.05$ ).

**Tabla 5.** Conteo total o absoluto (células/ $\mu$ L) de poblaciones de células mononucleares de sangre periférica humana, determinados por análisis de citometría de flujo

POBLACIÓN	F9-PI 5 $\mu$ g/mL (células/ $\mu$ L)	F9-PI 25 $\mu$ g/mL (células/ $\mu$ L)	EPG5 $\mu$ g/mL (células/ $\mu$ L)	PHA5 $\mu$ g/mL (células/ $\mu$ L)	CONTROL (células/ $\mu$ L)
SINGLETES	5537.22	7027.61	5234.39	5298.88	5419.60
LINFOCITOS FSC SSC	2475.81	1240.39	2403.71	2034.94	2475.16
LINFOCITOS CD45+	2468.23	1233.12	2395.15	2011.50	2465.31
LINFOCITOS CD3+	1708.95	561.95	1655.75	1321.34	1702.73
LINFOCITOS CD4+CD8- (LTh)	1036.23	348.63	998.32	713.66	1036.03
LINFOCITOS CD4+CD8+ (LTDP)	9.43	4.72	7.68	20.31	8.97
LINFOCITOS CD8+CD4- (LTc)	551.38	158.61	534.96	495.55	548.43
LINFOCITOS CD4-CD8- (LTDN)	111.90	50.00	114.79	91.81	109.29
LINFOCITOS CD45+CD19+ (LB)	180.03	169.18	163.92	151.68	184.45
LINFOCITOS CD45+CD3-CD16 bright (NK)	460.50	308.22	469.41	435.21	466.16
LINFOCITOS CD45+CD3+CD16dim (NKT)	24.97	12.29	22.70	27.87	25.00
MONOCITOS	988.45	2024.52	881.61	1046.61	1066.72
MONOCITOS CD45+	948.37	1973.25	843.71	983.96	1034.01
MONOCITOS CD4+	199.95	677.76	180.40	243.73	231.60
MONOCITOS CD4+CD16-	199.45	677.76	180.05	249.76	229.58

## 6. DISCUSIÓN

En el extracto obtenido de semillas de *L. mutabilis* Sweet, ecotipo Patón Grande se demostró la presencia significativa de proteínas y la notoria disminución del pigmento amarillo, luego del proceso de precipitación y dializado confirmándose lo referido por Caligari et al. (2000) quien afirma que de todas las especies de lupino, *Lupinus mutabilis* es el que posee el mayor porcentaje de proteínas en sus semillas, siendo las globulinas las principales macromoléculas de reserva que constituyen el 80-90% del total de proteínas (Suca & Suca 2015). La presencia del pigmento amarillo se debería a la presencia de ácidos fenólicos, flavonoides, taninos o carotenoides que formarían complejos con las proteínas (Martínez et al. 2000; Coloma 2009, Angarita 2016; Andor et al. 2016) los cuales se mantendrían durante el proceso de dializado (Figura 1).

En la purificación parcial del extracto proteico por cromatografía de exclusión molecular en *Sephadex* G-75 se observó la actividad hemaglutinante en el Pico I que correspondieron a las fracciones 9, 10, 11, 12 y 13 eluídas con buffer HEPESNaCaMn pH 6.8, mientras que los picos II y III no presentaron actividad hemaglutinante (Figura 2A). Duranti et al. (1995) identificaron la glicoproteína  $\gamma$ -conglutina en *Lupinus albus* con actividad de lectina. Falcon et al. (2000a) reportaron la actividad hemaglutinante del extracto de semillas maduras de tres especies de lupinos: *L. albus*, *L. angustifolius* y *L. mutabilis*. Sin embargo, en la purificación por cromatografía de afinidad realizada por los mismos autores en semillas maduras de *L. albus* no encontraron actividad hemaglutinante. A pesar de estos resultados el SDS-PAGE, la filtración en gel y la estructura secundaria por dicroísmo circular demostraron un espectro similar a la  $\gamma$ -conglutina (Falcon et al 2000b). Recientemente se ha determinado para la lectina semipurificada y purificada de *L. mutabilis* la actividad hemaglutinante que corresponde por las características físicas y químicas a la  $\gamma$ -conglutina (Rodríguez 2017); resultados que concuerdan con los obtenidos en este estudio.

Para la realización de la expresión génica e inmunofenotipificación escogimos la F9-PI debido a que presentaba la mayor actividad hemaglutinante, una banda de aproximadamente 42 KDa (correspondiente a la  $\gamma$ -conglutina) y, por la escasa y débil presencia de otras bandas de proteínas (Figura 2B). Ribeiro et al. (2014) identificaron en semillas de *L. albus* por SDS-PAGE no denaturante y otras técnicas una lectina de 42 KDa correspondiente a la  $\gamma$ -conglutina con actividad hemaglutinante.

Las células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP<sub>h</sub>) se consideran a menudo el estándar para investigar muchos aspectos de la respuesta inmunológica en un sistema de cultivo celular. Como una población mixta de linfocitos T, linfocitos B, células asesinas naturales (NK), monocitos, macrófagos y células dendríticas, las CMSP representan células clave implicadas en la expresión génica de citoquinas que conducen a respuestas inmunes innatas, adaptativas e inflamatorias (Denzler et al. 2010).

Algunas lectinas de plantas muestran efectos inmunomoduladores, tales como la actividad mitogénica y la inducción de respuestas por Th1, Th2 o Th17. El paso esencial para el inicio de la actividad inmunomoduladora de las lectinas es la unión a glicanos en la superficie celular y la inducción de la respuesta inmune por medio de mediadores como los segundos mensajeros, incremento del nivel de  $\text{Ca}^{+2}$ , producción de citoquinas específicas, unión a receptores, inicio de cascadas por unión al TCR entre otros mecanismos (Chilson & Kelly-Chilson 1989; Ashraf & Khan 2003; Majee & Biswas 2013). Del mismo modo, algunas lectinas pueden actuar como superantígenos (Licastro et al. 1993; Saul et al. 2000) o tener efectos apoptóticos indirectos a través de la inducción de citoquinas (Pierson & Liston 2010).

La IL-1 $\alpha$  es una potente citoquina proinflamatoria y pleiotrópica que es secretada por monocitos, macrófagos, células dendríticas, células B, fibroblastos, neutrófilos, células epiteliales entre otras. Esta citoquina estimula la expresión de genes de otras citoquinas inflamatorias, factores de

crecimiento de linfocitos, factores estimuladores de colonias y mesenquimales (Velez et al. 2004; Fettelschoss et al. 2011). El TNF- $\alpha$  es una citoquina pluripotencial proinflamatoria que regula una diversidad de respuestas celulares y es producida en primer lugar por monocitos y macrófagos (Esposito & Cuzzocrea 2009). El TNF- $\alpha$  tiene la capacidad de inducir la expresión de otras citoquinas proinflamatorias como la IL-1 y algunas quimioquinas. Además, se ha determinado que la señalización para TNF- $\alpha$  son mediadas por otras citoquinas proinflamatorias como IL-1 (Probert et al.1995).

En este estudio el tratamiento de la CMSPH con el EPG 5  $\mu$ g/mL y la F9-PI 5  $\mu$ g/mL, incrementó la expresión de la IL-1 $\alpha$  y el TNF- $\alpha$  mRNA a las 24 y 72 h de incubación con respecto al control ( $p < 0.05$ ). A las 24 h de incubación el EPG y la F9-PI incrementó la expresión del TNF- $\alpha$ , mientras que la expresión de la IL-1 $\alpha$  no mostró diferencias significativas con relación a PHA ( $p < 0.05$ ) (Figura 6 A y B). A las 72 h el EPG 5  $\mu$ g/mL incrementó significativamente la expresión de la IL-1 $\alpha$  con respecto a la PHA (Figura 7A). Con relación a la expresión de TNF- $\alpha$  mRNA no se observó diferencias estadísticamente significativas en cultivos tratados con el EPG y la F9-PI 5  $\mu$ g/mL en relación a la PHA (Figura 7B). La F9-PI 5  $\mu$ g/mL mostró una disminución en la expresión génica de la IL-1 $\alpha$  y el TNF- $\alpha$  con respecto a la PHA ( $p > 0.05$ ).

Se ha demostrado que las lectinas tiene la capacidad de inducir y regular la expresión de citoquinas *in vitro* e *in vivo* (Ooi et al. 2002; De Melo et al 2011; De Oliveira et al. 2013). En 1991 Mämmel et al. determinaron en cultivos de monocitos de sangre periférica humana tratados durante 2 h con 10  $\mu$ g/mL de la lectina de *Viscum album* (MLI), la misma expresión del TNF- $\alpha$  mRNA que en monocitos activados con 100 U IFN- $\gamma$ . Además encontraron que macrófagos peritoneales de ratón estimulados con MLI inducen la expresión del TNF- $\alpha$  mRNA. Hostanska et al. (1995) encontraron en células mononucleares de sangre periférica humana tratadas durante 24 h con concentraciones de ML-I (1-10 ng/mL) la expresión de la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , GM-CSF e IL-10 mRNA; mientras que no fue detectada la

expresión de la IL-2 e IL-5. Sin embargo a concentraciones de 1 ng/mL ML-I solo se observó la expresión de IL-10, sin detectar la expresión de la IL-2 e IFN- $\gamma$ . Fan et al. (1998) encontraron el máximo nivel de expresión de la IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  mRNA en CMSPH estimulados con 5  $\mu$ g/mL PHA entre 4-24 h de incubación. Lyu & Park (2007) determinaron en cultivos de linfocitos T humanos tratados con 25 pg/mL de la aglutinina de *Viscum álbum* L. var. *coloratum* (VCA) durante 8 h, la expresión de citoquinas proinflamatorias como la IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 y IFN- $\gamma$ . Además observaron que la incubación de células T durante 2 h con 1.5 ng/mL VCA no permitió la detección de la IL-1 $\alpha$  e IL-6 mRNA.

Aunque muchos autores concuerdan en que el tiempo de incubación y la concentración de la lectina juegan un rol importante en la inducción de la expresión génica de citoquinas, es necesario tener en cuenta que existen diferencias dependiendo del individuo evaluado (Fan et al. 1998).

La IL-10 es una potente citoquina inmunorreguladora involucrada tanto en la respuesta inmune como la inflamación y es producida por células Th2, células Tr1, células Th1, células Th17, células T CD8+, monocitos-macrófagos estimulados y subpoblaciones de células dendríticas, células B, eosinófilos, mastocitos entre otros (Mosser & Zhang 2008). Sus principales funciones son limitar y terminar la respuesta inflamatoria, bloquear la secreción de citoquinas proinflamatorias (IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12) así como quimioquinas inflamatorias (tipos CC y CXC), inhibe la síntesis de citoquinas Th2 (IL-4 e IL-5) y regula la diferenciación y proliferación de las células T, células B, células NK, células presentadoras de antígeno, mastocitos y granulocitos (Li et al. 2004; Belisario et al. 2017).

Con relación a la IL-10 no se demostró su expresión en los cultivos luego de 24 h de incubación con las concentraciones del EPG 5  $\mu$ g/mL y la F9-PI 5  $\mu$ g/mL (Figura 8A). A las 72 h de incubación se determinó la expresión de la inmunocitoquina en cultivos tratados con la F9-PI 5  $\mu$ g/mL sin diferencia estadísticamente significativas con respecto a la PHA ( $p>0.05$ ) (Figura 8B). Debido a estos resultados se optó por incrementar la



concentración de la fracción a 25 µg/mL encontrándose un aumento significativo cuando se comparó con el control y la PHA 5 µg/mL ( $p>0.05$ ) (Figura 8C).

Aunque la mayoría de los tipos celulares tanto de la inmunidad natural como adaptativa son capaces de expresar la IL-10 en varios grados, los productores clave son las células T reguladoras (Treg) Foxp3 +. La IL-10 presenta funciones opuestas, por un lado promueve su propia producción, así como la función de las células Treg, iniciando un ciclo de retroalimentación positiva y por otro aumentaría la apoptosis de células T doble negativas (DN) (Pierson & Liston 2010).

El TGF- $\beta$  es una citoquina inmunorreguladora producida por amplio rango de células que incluyen macrófagos, células NK, células T y células B. Esta citoquina es un importante regulador de la inflamación ya que posee propiedades proinflamatorias y anti-inflamatorias dependiendo de su concentración; a bajas concentraciones tiene propiedades proinflamatorias y recluta monocitos, células T y neutrófilos al lugar de inflamación durante una infección, mientras que a altas concentraciones presenta actividad antiinflamatoria, suprimiendo el TNF- $\alpha$  y el óxido nítrico en macrófagos, inhibe la producción del IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  en células NK e indirectamente disminuye la expresión MHC clase II (López & Ramos 2008).

En el caso de la expresión del TGF- $\beta$  mRNA en células mononucleares tratadas con el extracto y la fracción durante 24 h no se observó diferencias significativas con respecto a la PHA ( $p>0.05$ ), sin embargo su expresión presentó resultados significativos con respecto al control ( $p<0.05$ ) (Figura 9A), mientras que a las 72 h de tratamiento la expresión no mostró diferencias significativas con relación al control y PHA (Figura 9B).

El TGF- $\beta$  ha sido identificado como un inductor de células productoras de IL-17 en condiciones inflamatorias (Weaver et al. 2006) y bajo condiciones de cultivo en combinación con la IL-6 promueve la diferenciación

de Th17 (Wan & Flavell 2007), pero inhibe la diferenciación de células Treg (Kimura & Kashimoto 2010). En este estudio encontramos la expresión de la IL-6 luego de 24 de tratamiento con la fracción (datos no mostrados) lo que llevaría a pensar que podría inducirse la diferenciación de células Th17. Sin embargo, se observó luego de 72 h un incremento de la expresión de IL-10 a concentraciones de la fracción de 25 µg/mL, que unido a la presencia del TGF-β induciría un patrón de células T reguladoras. Los resultados obtenidos concuerdan con los de Peron (2015) quien encontró en células esplénicas de ratón tratadas con 37 ng de la lectina de *Tabernaemontana hystrix* un aumento de la expresión del TGF-β. Sin embargo al incrementar la concentración de la lectina no observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión del TNF-α, IL-10 e IL-6 mRNA luego de 72 h de incubación.

En este estudio la expresión de la IL-2 mRNA en cultivos tratados con el extracto y la fracción luego de 24 y 72 horas fue negativa (Figura 10).

Con relación al IFN-γ, se observó que el tratamiento de las células con 5 µg/mL del extracto proteico no induce la expresión de mensajeros de RNA (datos no mostrados). Sin embargo, cuando se evaluó la fracción a concentraciones de 5 y 25 µg/mL durante 24, 48 y 72 h se observó la expresión génica de IFN-γ sin diferencias estadísticamente significativas con respecto a PHA ( $p > 0.05$ ) (Figura 11 A, B y C). Sin embargo, a las 48 y 72 h se observaron diferencias significativas en su expresión con relación al control ( $p < 0.05$ ) (Figura 11 B y C). El IFN-γ es sintetizado por linfocitos Th1CD4+, linfocitos citotóxicos CD8+, células NK, células B, células NKT y células presentadoras de antígeno (CPA). La secreción de IFN-γ por células NK y CPA es importante en estadios iniciales de la infección, mientras que su producción por linfocitos T es importante en la respuesta inmune adaptativa (Razaghia et al. 2016).

Los resultados obtenidos mediante citometría de flujo demostraron que el tratamiento de las CMSPH con la concentración de la fracción F9-PI 25 µg/mL disminuyó la población de linfocitos FSC SSC con relación a los

controles y los tratamientos (EPG 5 µg/mL y F9-PI 5 µg/mL) (Anexo 6). Esto se debería a un probable efecto apoptótico lo que influiría sobre el incremento de los porcentajes relativos de las poblaciones celulares. Cabe destacar que se ha determinado que bajas concentraciones de las lectinas y cortos tiempos de incubación producen efectos mitogénicos, mientras que mayores concentraciones y tiempos más prolongados de incubación inducen la muerte celular (Benoist et al. 2009). A pesar de este efecto, en cultivos tratados con la F9-PI 5 µg/mL, no se observó un incremento significativo en el porcentaje de células de la inmunidad innata y adaptativa con relación al control y PHA ( $p>0.05$ ), mientras que el tratamiento con F9-PI 25 µg/mL demostró un aumento significativo del porcentaje de linfocitos CD3-CD16<sup>bright</sup>, CD4+CD8-, CD4-CD8-, CD3-CD19+ y monocitos CD45+CD4+ con respecto al control y PHA ( $p<0.05$ ) (Figura 12, 13, 14, 16 y Anexo 6). Se ha observado que la lectina Morniga M (*Morus nigra*) y artocarpina (*Artocarpus integrifolia*) activan linfocitos T y NK en estudios *in vitro* con CMSPh, mientras que la artocarpina activa algunas células B (CD19+). Además, Morniga M facilita la selección de linfocitos CD4+CD8+ (Benoist et al. 2009). Es probable como en el caso de la ConA que el entrecruzamiento con el TCR produzca la activación de vías de señalización de sobrevivencia en células CD4+CD8+ (Pongracz et al. 2003).

Las CMSPh tratadas con el extracto y la fracción no presentaron diferencias significativas en las células NKT con relación al control y PHA ( $p>0.05$ ). Miyagi et al. (2014) demostraron que bajas dosis de ConA induce la activación de células NK y NKT. Los tratamientos con el EPG 5 µg/mL no mostraron diferencias en los porcentajes de las poblaciones estudiadas en comparación al control. Sin embargo, cuando se comparó el tratamiento EPG 5 µg/mL con la PHA se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4-CD8-, CD3-CD19+, CD3+-CD16<sup>bright</sup> (NK), CD3-CD16<sup>dim</sup> (NKT) y monocitos CD45+CD4+. La PHA 5µg/mL presentó poco incremento en el porcentaje de poblaciones de linfocitos, CD4+CD8+, CD4-CD8+, CD4-CD8-, CD3-CD19+, CD3+-CD16<sup>bright</sup> (NK), CD3-CD16<sup>dim</sup> (NKT) y monocitos CD45+CD4+ con respecto al control (Anexo 6).

El origen de las células T doble positivos (DP) CD4+CD8+ periféricas no está bien definido. Las células T CD4+CD8+ han sido identificados en sangre periférica humana y representan el 1-3 % del total de linfocitos T (Giraldo et al. 2011). Estas células constituirían timocitos DP que han escapado prematuramente del timo denominado “teoría del escape del timo” o células T simple positivo que expresan un “segundo marcador” como consecuencia de una sobreestimulación antigénica (Jiménez et al. 2002; Giraldo et al. 2011). Las células T doble negativas (DN) CD4-CD8- comprenden el 1-3% de las células T periféricas y han sido identificadas por sus funciones regulatorias (Treg DN) y efectos inflamatorios asociados con enfermedades autoinmunes. Estas células originadas en el timo escapan de la selección negativa y migran a la periferia donde se expanden luego del contacto antigénico (D’Acquisto & Crompton 2010; Ji et al 2016). Crispin & Tsokos (2009) han determinado que las células T (CD4-CD8-) derivarían de células T CD8 estimuladas, adquiriendo una distintiva producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 e IL-10). Del mismo que De Amat (2015) quien trabajó con una fracción del extracto de lectinas de *L. mutabilis* ecotipo Patón Grande no hemos encontrado diferencias significativas con relación al porcentaje de linfocitos CD4+CD8- y CD4-CD8+ con el EPG 5 µg/mL y la F9-PI 5 µg/mL con respecto al control (Anexo 6).

En el caso del receptor CD3+CD25+ se observó un incremento estadísticamente significativo en el tratamiento con PHA 5 µg/mL ( $p < 0.05$ ), mientras que el EPG 5 µg/mL y las fracciones F9-PI (5 y 25 µg/mL) no mostraron diferencias significativas con respecto al control ( $p > 0.05$ ) (Figura 15). Se ha determinado que CMSPH estimulados con jacalin no inducen la expresión de IL-2 mRNA, sin embargo expresan CD25 lo cual sería simplemente consecuencia de la activación de las células T ocasionada por los altos niveles de IL-6 e IFN- $\gamma$  (Blasco et al. 1995). Por otro lado, de Amat (2015) determinó que el tratamiento de CMSPH con concentraciones de el EPG 1, 5, 10, 20 y 50 µg/mL estimula la expresión del receptor CD25 y la formación de rosetas en cultivos de células mononucleares; siendo la menor concentración la que indujo la mayor expresión en 43.7%; resultados que

difieren de los obtenidos en este estudio, probablemente debido a un mayor tiempo de incubación con el extracto proteico.

El TGF- $\beta$  inhibe la sobreexpresión de CD25 inducida por IL-2 (Kehrl et al. 1986). Los estudios indican que en el inicio de la respuesta inflamatoria el TGF- $\beta$  incrementa el reclutamiento de células vírgenes y durante el curso de la reacción promueve la expansión celular y la generación de células memoria; sin embargo una vez que el estímulo inicial ha sido eliminado y la producción local de IL-2 cesa promovería la eliminación de células pos activadas (Silleit et al. 2001).

Se ha observado que la aglutinina de *Viscum album* (VCA) inhibe la proliferación de CMSPH y linfocitos T humanos estimulados con anticuerpos anti-CD3/CD28 a elevadas concentraciones por inducción de apoptosis (Lyu et al. 2007).

El número total de células (valor absoluto) obtenidos por citometría de flujo tratadas con el EPG 5  $\mu\text{g/mL}$  no presentaron diferencias significativas en el número total de linfocitos células CD3-CD16<sup>bright</sup> (NK), CD3+CD16<sup>dim</sup> (NKT), linfocitos CD4+CD8+, CD4-CD8-, linfocitos CD3-CD19+ y monocitos CD45+CD4+ con respecto a los controles ( $p>0.05$ ), sin embargo se observó un incremento en el número de linfocitos CD4+CD8- y CD4-CD8+ cuando se relacionó con la PHA. En el caso de la fracción F9-PI 5 $\mu\text{g/mL}$  se observó un incremento del número total de linfocitos NK, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8- y LB con respecto a PHA, pero con una disminución en la población de NKT y monocitos con respecto al control ( $p>0.05$ ). Cuando la concentración de la fracción se incrementó F9-PI 25  $\mu\text{g/mL}$  todas las poblaciones disminuyeron con excepción de los monocitos quienes se incrementaron significativamente con respecto al control y PHA ( $p<0.05$ ) (Tabla 5). La PHA 5  $\mu\text{g/mL}$  indujo el incremento significativo del número de linfocitos CD4+CD8+ (20.3 células/ $\mu\text{L}$ ) en comparación al control ( $p<0.05$ ), mientras que se observó un aumento no significativo en el número total de monocitos CD45+CD4+ y linfocitos CD3+CD16<sup>dim</sup> (NKT) con respecto al control

( $p > 0.05$ ) (Tabla 5). Se ha determinado que la PHA induce la expresión de CD4 en células T CD8 y la expresión de CD8 en células T CD4 (Sullivan et al. 2001).

El tratamiento de CMSPH con la F9-PI 25  $\mu\text{g/mL}$  incrementó significativamente el porcentaje y número total de monocitos (CD45+CD4+CD16-) (Tabla 4 y Anexo 6). Al respecto, Guzmán et al. (2013) determinaron en CMSPH una mayor afinidad de la lectina de *Olnya tesota* (IF2) sobre monocitos que en linfocitos T y B. Zhen et al. (2014) demostraron que la activación de la molécula CD4 en monocitos humanos al interaccionar con MHC II promueve la expresión de citoquinas proinflamatorias y su diferenciación en macrófagos. Además, se ha determinado que la combinación de la IL-4/IL-10/TGF- $\beta$  induce el fenotipo inmunosupresor de macrófagos M2 que se caracterizan por una elevada producción de IL-10 y un descenso en la expresión del TNF- $\alpha$ , IL-6, CD86, CD274 y MHC II (Mia et al. 2014).

En su conjunto, cuando se relaciona el ligando glucídico de la lectina, su efecto en la expresión génica y los porcentajes y/o recuento total de las poblaciones de CMSPH se puede inferir de acuerdo a los resultados que el tratamiento de las células mononucleares con la lectina contenida en el extracto proteico y la fracción podría interaccionar con una estructura del receptor que contiene D-galactosa de los monocitos/macrófagos (Mämmel et al. 1991). Es importante considerar que Rodríguez (2017) determinó el efecto inhibitorio de la galactosa y melibiosa sobre la capacidad hemaglutinante de la lectina en el EPG y la fracción de *L. mutabilis*. Además, la afinidad de la galactosa se corroboró debido a la actividad hemaglutinante de la lectina sobre eritrocitos de conejo que exponen este monosacárido en sus membranas (Yamakahua 2005). El análisis por citometría y la expresión génica en CMSPH tratadas con el EPG 5  $\mu\text{g/mL}$  a las 72 h de incubación indujo la expresión del gen IL-1 $\alpha$  con relación a los controles, mientras que incrementó y disminuyó la expresión del TNF- $\alpha$  mRNA con respecto al

control y la PHA respectivamente. Además, mostró mayor número total de linfocitos NK y CD4-CD8- con respecto a los controles.

En el caso de F9-PI 5 µg/mL se observó una disminución en la expresión del gen IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IL-10 e IFN- $\gamma$  con respecto a la PHA, sin embargo mostró un incremento en la expresión de IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  cuando se comparó con el control. Además, el tratamiento a la misma concentración aumentó el recuento total de células NK, CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8- y LB con relación a la PHA (Tabla 5). Por otro lado, cuando se incrementó la concentración de la fracción a 25 µg/mL se observó una elevada expresión del gen IL-10. En este estudio no se realizaron pruebas con esta concentración para determinar la expresión génica de la IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ . Sin embargo, fue la concentración donde se observó un incremento en el porcentaje de las poblaciones de NK, CD4+CD8-, CD4-CD8-, LB, y monocitos, mientras que el conteo total de células indicó un mayor número de LB con relación a la PHA ( $p>0.05$ ) y un aumento significativo de monocitos con respecto a la PHA y el control ( $p<0.05$ ) (Tabla 5).

Es preciso indicar que la PHA 5 µg/mL incrementó significativamente la expresión de la IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-10, TGF- $\beta$ . Además, se observó un incremento significativo en el número total de CD4+CD8+ con relación al control. Mueller & Anderer (1990) determinaron que una fracción parcialmente purificada de *Viscum album* activa células NK pero cuando se preincuba con CMSPH activa únicamente a monocitos/macrófagos. Además, demostraron que la falta de activación de las células NK en CMSPH tratadas con la fracción se relacionó con un incremento de la prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) generados por monocitos/macrófagos en asociación con la producción de IFN- $\gamma$  o por efectos sinérgicos con la IL-1 y el TNF- $\alpha$ . Se ha determinado que la lectina jacalin específica de galactosa puede interactuar con el CD45 en células T incrementando la señalización por TCR y regulando positivamente los umbrales de activación de las células T y la secreción de citoquinas Th1/Th2 (Baba et al. 2007).

Los monocitos humanos se dividen en tres tipos: monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), monocitos intermedios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) y monocitos no clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). El fenotipo CD14<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> representa el 80-90% del total de monocitos sanguíneos y produce la IL-10 en lugar del TNF y la IL-1 en respuesta a LPS *in vitro* (Auffray et al. 2009). Los monocitos son células que circulan en la sangre, médula ósea y bazo y, no proliferan en un estado estacionario (*steady state*) (Geissmann et al. 2010). Sin embargo, existen evidencias de la proliferación de monocitos luego de la inducción del CD137 (Langstein et al. 1999), estimulación *in vitro* con Factor estimulante de colonias macrófagos (M-CSF) y CSF-1 (Clanchy et al. 2006; Lari et al. 2009), ligando Flt3 (FL, citoquina hematopoyética) (Kim et al. 2015) e insulina (Naderi 2015).

Debido a la proliferación de los monocitos humanos y al incremento transcripcional del gen de la IL-10, a partir de los resultados obtenidos en el presente estudio se postulan las siguientes hipótesis:

**(1) Sobre la expresión génica transcripcional y proliferación de monocitos.** Se conoce que la lectina de la F9-PI ( $\gamma$ -conglutina) mimetiza a la insulina en su interacción por el IR fosforilando y activando quinasas intracelulares comunes a la cascada de señalización de la insulina (Terruzzi et al. 2011). Además, se ha comprobado que la insulina presenta actividad proliferativa sobre monocitos (Naderi 2015). Por tanto, la F9-PI ( $\gamma$ -conglutina) podría unirse al IGF-1R y activar vías de señalización intracelulares que producirían un efecto proliferativo de los monocitos y la expresión génica de citoquinas (Figura 17).

**(2) Sobre la interacción de la F9-PI ( $\gamma$ -conglutina) con el receptor CD45 de monocitos clásicos, y el receptor IGF-1R.** El receptor CD45 de los monocitos tiene galactosa en su estructura que le confiere afinidad por la F9-PI ( $\gamma$ -conglutina) cuyo ligando también es galactosa (Rodriguez 2017); por tanto el CD45 interaccionaría con la lectina ( $\gamma$ -conglutina); esta relación se ha observado con otras lectinas (Mämmel et al. 1999; Baba et al. 2007). La  $\gamma$ -conglutina captada mediante el CD45 tanto de monocitos clásicos (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup>), monocitos intermedios (CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>) y monocitos no



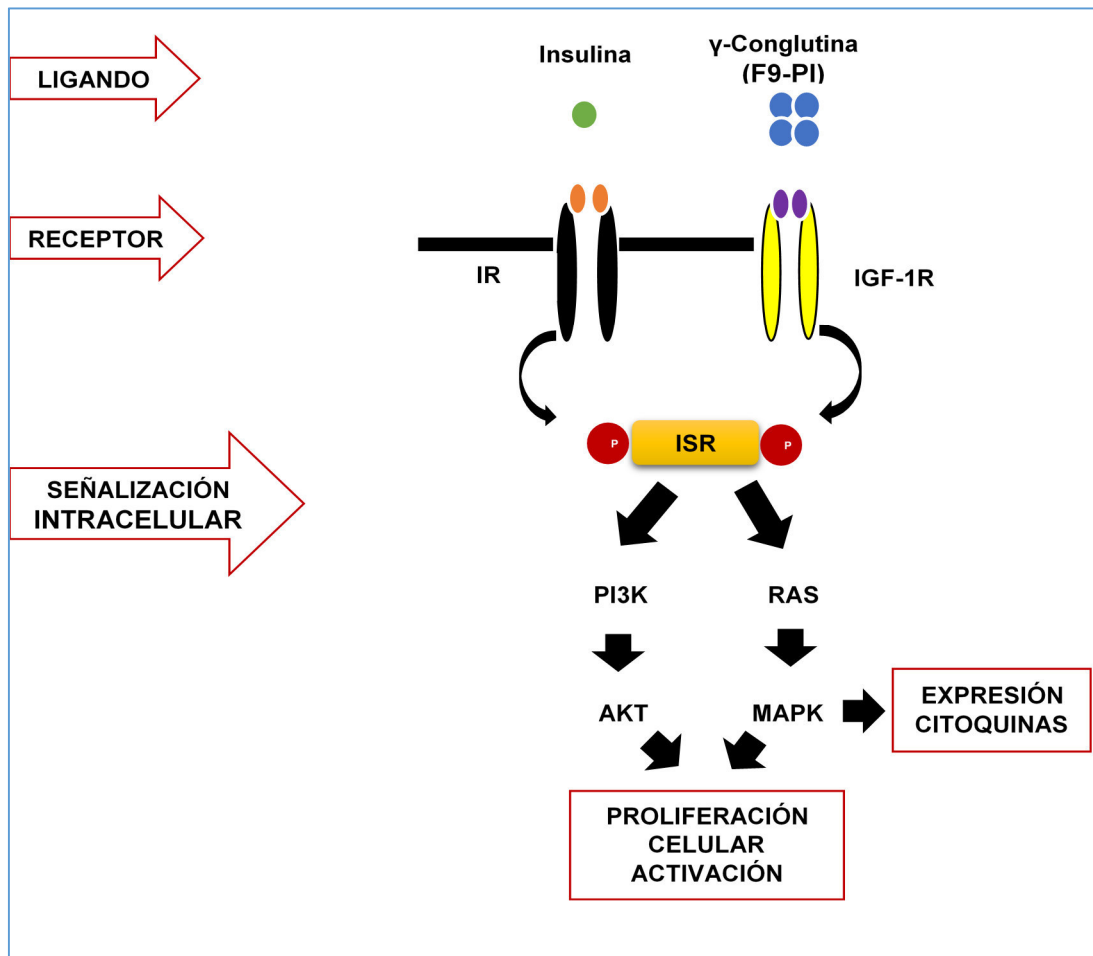
clásicos (CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>) activaría la expresión transcripcional de diversas citoquinas.

La lectina F9-PI ( $\gamma$ -conglutina) también podría ligarse al receptor IGF-1R transduciendo señales que conllevan principalmente a la proliferación de los monocitos clásicos (80-90% del total de monocitos) e incrementando la expresión transcripcional del gen IL-10. Los monocitos no clásicos también podrían contribuir con el incremento de la expresión génica de la IL-10 (Wong et al. 2015). El IFN- $\gamma$  producido por los linfocitos NK, NKT, LTh y LTc; unido a la IL-10 producida por los monocitos clásicos y no clásicos regularía de manera negativa la expresión de IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$  generada por los monocitos intermedios (Auffray et al. 2009). Esta citoquina (IL-10) activaría células reguladoras (Treg y Breg) incrementando la transcripción (mRNA) para IL-10 y TGF- $\beta$ , citoquinas que inciden sobre la población de LB inhibiendo su proliferación y el cambio de clase (Rosser & Mauri 2015; Sanjabi et al. 2017). Además, la IL-10 influiría en los efectos anti-apoptóticos (Eslick et al. 2004) (Figura 18).

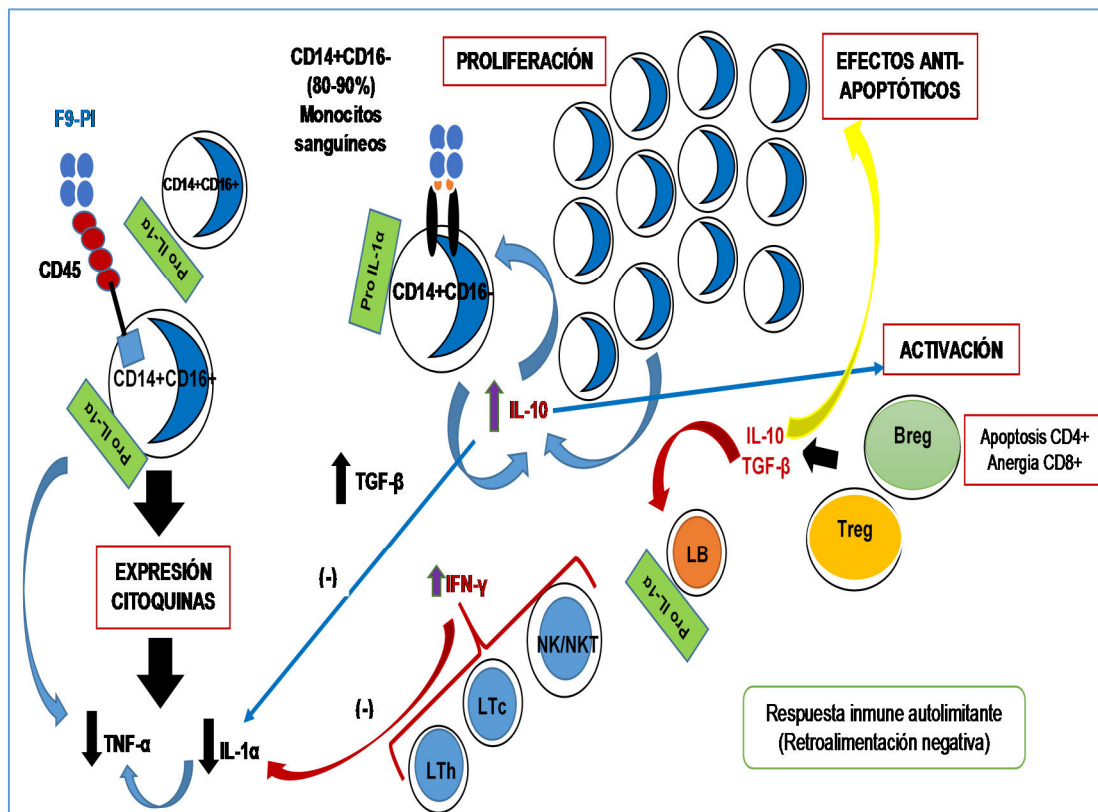
Es conocido que la IL-10 se produce a las 24-48 h después de la activación de los linfocitos y que la síntesis generada de esta citoquina por los monocitos se incrementa por el TNF- $\alpha$  y la IL-1 (Parry et al. 1997). De Wall et al. (1993) demostraron un efecto directo de la IL-10 en la proliferación de las células T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica humana en ausencia de CPA. La interacción de la IL-10/IL-10R en las células T interfiere con la producción de IL-2 pero no interfiere en la expresión de IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  y GM-CSF. Se ha demostrado que la IL-10 afecta de manera indirecta la proliferación de las células T a través de la inhibición de las funciones coestimuladoras de las CPA (Groux et al. 1998). Los estudios sobre el efecto de la IL-10 en la producción de citoquinas son variables. Eder (2000) demostró la capacidad de la IL-10 de bloquear la proliferación activada por PHA y la producción de IL-2, IFN- $\gamma$  o TNF- $\alpha$  en CMSP en comparación a la IL-4 y TGF- $\beta$ . Las células CD8<sup>+</sup> son más sensibles que las células CD4<sup>+</sup> a la inhibición inducida por IL-10 (Nishijima et al. 1994).

El pleiotropismo (capacidad para actuar en diferentes tipos de células) de las citoquinas sobre la inmunidad innata y adaptativa, aunque permite diversas actividades, produce numerosos efectos secundarios que limitan su uso terapéutico (Souza et al. 2013). Al parecer la inducción de varias citoquinas indicaría el carácter pleiotrópico de la lectina de *L. mutabilis* al activar una variedad de células del sistema inmune con la capacidad de equilibrar los efectos pro y antiinflamatorios.

Si bien la expresión de un número limitado de citoquinas no permite proporcionar una comprensión amplia y completa del efecto de la lectina sobre las CMSPH; el estudio realizado proporciona nuevas luces para la búsqueda de las ventajas y desventajas del uso de esta lectina.



**Figura 17.** Interacciones hipotéticas de la F9-PI 25 µg/mL de *L. mutabilis* con el IGF-1R y su efecto sobre la expresión génica transcripcional de citoquinas y la proliferación celular. Del mismo modo que la insulina se une a los receptores IR/IGF-1R y activa las vías de señalización involucradas en la proliferación celular, la lectina F9-PI (γ-conglutina) que mimetiza a la insulina, podría unirse al receptor del factor de crecimiento de la insulina tipo I (IGF-1R) y activar la fosforilación/activación de quinasas intracelulares comunes a la cascada de señalización de la insulina que permitirían la proliferación celular, activación y expresión de citoquinas. ISR: sustrato receptor de la insulina, PI3K: fosfoinositol 3 quinasa, AKT: proteína quinasa B, MAPK: protein kinasas activadas por mitógenos.



**Figura 18.** Efecto hipotético de la interacción de la F9-PI 25 µg/mL de *L. mutabilis* sobre la proliferación de monocitos clásicos de sangre periférica. La F9-PI (γ-conglutina) con afinidad por galactosa presente en el receptor CD45 de monocitos clásicos (CD14++CD16-), monocitos intermedios (CD14++CD16+) y monocitos no clásicos (CD14+CD16++) podría activar la expresión transcripcional de citoquinas. La F9-PI también podría ligarse con el IGF-1R produciendo principalmente la proliferación de los monocitos clásicos e incrementando la expresión transcripcional del gen IL-10. El IFN-γ producido por los linfocitos NK, NKT, LTh y LTc unido a la IL-10 regularía de manera negativa la expresión de la IL-1α y el TNF-α producido por los monocitos intermedios. La IL-10 activaría células reguladoras (Treg y Breg) productoras de IL-10 y TGF-β inhibiendo la proliferación de LB. Además, la IL-10 produciría efectos anti-apoptóticos.

## 7. CONCLUSIONES

- 7.1 El extracto proteico de *L. mutabilis* estimula la expresión transcripcional de IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$ .
- 7.2 La lectina semipurificada F9-PI ( $\gamma$ -conglutina) a la concentración de 5  $\mu$ g/mL estimula el aumento de la expresión transcripcional del gen de IL-1 $\alpha$  y TNF- $\alpha$ , mientras que a la concentración de 25  $\mu$ g/mL incrementa significativamente la expresión de IL-10.
- 7.3 El extracto proteico y la lectina de la F9-PI ( $\gamma$ -conglutina) a la concentración de 5  $\mu$ g/mL no producen el incremento del porcentaje y número total de linfocitos y monocitos.
- 7.4 La lectina semipurificada F9-PI a la concentración 25  $\mu$ g/mL ocasiona el incremento significativo del porcentaje y número total de monocitos clásicos CD4+CD16- *in vitro*.

## **8. RECOMENDACIONES**

- 8.1 Evaluar a la concentración de 25 µg/mL sobre la expresión génica de la IL-1α, el TNF-α y el TGF-β.
- 8.2 Determinar el efecto citotóxico de la fracción a la concentración de 25 µg/mL mediante ensayos de apoptosis.
- 8.3 Evaluar la secreción de citoquinas pro y antiinflamatorias a través de ensayos de ELISA con el fin de compararlos con la expresión génica.
- 8.4 Realizar el marcaje de la lectina con compuestos fluorescentes y ampliar el panel de anticuerpos anti-CD con el objetivo de definir la diferencia de afinidad de la lectina sobre las poblaciones celulares.
- 8.5 Evaluar la lectina sobre la población de monocitos de sangre periférica o líneas celulares monocíticas de origen humano.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar, L. A. (2015). Evaluación del rendimiento de grano y capacidad simbiótica de once accesiones de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet), bajo condiciones de Otuzco - La Libertad. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú.
2. Andor, B., Danciu, C., Alexa, E., Zupko, I., Hoge, E., Cioca, A., ... Dehelean, C. (2016). Germinated and Ungerminated Seeds Extract from Two *Lupinus* Species: Biological Compounds Characterization and *In Vitro* and *In Vivo* Evaluations. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2016, 7638542. <http://doi.org/10.1155/2016/7638542>.
3. Angarita, S. (2016). Perfilado metabólico de ejemplares del género *Lupinus* (Fabaceae) presentes en Cundinamarca y Boyacá. Tesis para pregrado. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, Colombia.
4. Akalere, O. (1993). Nature's medicinal bounty; don't throw it away. *Traditional Medicine. World Health Forum*, 14, 390-395.
5. Ashraf, M.T., & Khan, R.H. (2003). Mitogenic lectins. *Medical Science Monitor*, 9(11), RA265-9.
6. Auffray, C., Sieweke, M., & Geissmann, F. (2009). Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 27(1), 669-692. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557.
7. Baba, M., Yong Ma, B., Nonaka, M., Matsuishi, Y., Hirano, M., Nakamura, N., Kawasaki, N., Kawasaki, N., Kawasaki, T. (2007) Glycosylation-dependent interaction of jacalin with CD45 induces T lymphocyte activation and Th1/Th2 cytokine secretion. *Journal of Leukocyte Biology*, 81, 1002–1011.
8. Barrios, I., Anido, V., & Morera, M. (2016). Declaración de Helsinki: cambios y exégesis. *Revista Cubana de Salud Pública*, 42(1) Recuperado en 12 de septiembre de 2017, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-34662016000100014&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-34662016000100014&lng=es&tlng=es).

9. Bekeredjian, I., Foermer, S., Kirschning, C.J., Parcina, M., & Heeg, K. (2012). Poke weed mitogen requires Toll-like receptor ligands for proliferative activity in human and murine B lymphocytes. *PLoS One*, 7(1), e29806. doi: 10.1371/journal.pone.0029806.
10. Belisário, A. R., Sales, R. R., Toledo, N. E., Velloso-Rodrigues, C., Silva, C. M., & Viana, M. B. (2017). Interleukin-10 haplotypes are not associated with acute cerebral ischemia or high-risk transcranial Doppler in a newborn cohort of 395 children with sickle cell anemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 39(2), 108–114. <http://doi.org/10.1016/j.bjhh.2016.09.017>.
11. Benoist, H., Culerrier, R., Poiroux, G., Ségui, B., Jauneau, A., Van Damme, E.J., Peumans, W.J., Barre, A., Rougé, P. (2009). Two structurally identical mannose-specific jacalin-related lectins display different effects on human T lymphocyte activation and cell death. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(1), 103-14. doi: 10.1189/jlb.0708434.
12. Bezerra, G.A., Viertlmayr, R., Moura, T.R., Delatorre, P., Rocha, B., et al. (2014) Structural Studies of an Anti-Inflammatory Lectin from *Canavalia boliviana* Seeds in Complex with Dimannosides. *PLOS ONE* 9(5), e97015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097015>.
13. Borja, J.E. (2014). Obtención de péptidos bioactivos de *Lupinus mutabilis* ("tarwi") mediante proteasas de *Bacillus* sp. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
14. Caligari P.D.S., Römer P., Rahim M.A., Huyghe C., Neves-Martins J., & Sawicka Sienkiewicz E.J. (2000). The potential of *Lupinus mutabilis* as a crop. En: Knight R, editor. Linking Research and Marketing Opportunities for Pulses in the 21st Century. Washington, D.C.: Kluwer Academic Publishers; (34), 569 -5 73. doi: 10.1007/978-94-011-4385-1\_54.
15. Camarena, F., Huaringa, A., Jimenez, J., & Mostacero, E. (2012). Revaloración de un cultivo subutilizado: Chocho o Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Universidad Nacional Agraria de La Molina – Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica.
16. Cardoso, M. R. D., Mota, C. M., Ribeiro, D. P., Noletto, P. G., Andrade, W. B. F., Souza, M. A., ... Silva, D. A. O. (2012). Adjuvant and



immunostimulatory effects of a D-galactose-binding lectin from *Synadenium carinatum* latex (ScLL) in the mouse model of vaccination against neosporosis. *Veterinary Research*, 43(1), 76. <http://doi.org/10.1186/1297-9716-43-76>.

17. Castañeda, C. B., Manrique M. R., Ibáñez, V. L., Gamarra, C. F., Galan, L. D. & Quispe, H. P. (2002). Evaluación del efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de las semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi, Chocho), en Animales de Experimentación. *Revista Horizonte Médico*, 2(1-2), 35-47
18. Castañeda, B., Castro de la Mata, R., Manrique, R., & Ibañez, L. (2007). Efectos metabólicos de *Lepidium meyenii* Walpers, "MACA" y *Lupinus mutabilis* Sweet, "CHOCHO" en ratas. *Horizonte Médico*, 7(1), 32-38.
19. Castañeda, B., Apaza, R., Barreto, V., Bejarano, G., Calderón, G., Cárdenas, R., Carita, C., Castillón, F., Charaja, S., Cruz, M., Espinoza, V., Ibáñez, L. & Gamarra, F. (2013). Efecto analgésico del *Lupinus mutabilis* S (Chocho) comparado con morfina. *Cultura: Revista de la Asociación de Docentes de la USMP*, 27, 243-254.
20. Castillo, A., & Abdullaev, F. (2005). Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Revista de investigación clínica*, 57(1), 55-64. Recuperado en 14 de abril de 2017, de [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S003483762005000100007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003483762005000100007&lng=es&tlng=es).
21. Ceroni, A. (2003). Distribución de las leguminosas de la parte alta de la Cuenca la Gallega Morropón Piura. *Ecología Aplicada*, 2(1), 9-13.
22. Coelho, L.C., Silva, P.M., Lima, V.L., Pontual, E.V., Paiva, P.M., Napoleão, T.H., & Correia, M.T. (2017). Lectins, Interconnecting Proteins with Biotechnological/Pharmacological and Therapeutic Applications. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1594074. doi: 10.1155/2017/1594074.
23. Coloma, J. (2009). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis para pregrado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador.

24. Chauca, N. (2016). Evaluación de la actividad inmunomoduladora y leishmanicida de extractos y fracciones de lectinas de semillas de dos ecotipos de *Lupinus mutabilis* (Fabaceae). Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
25. Chanput, W., Mes, J., Vreeburg, R., Savelkoul, H., Wichers, H. (2010). Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food Function*, 1(3), 254-61. doi: 10.1039/c0fo00113a.
26. Chen, Y., Jiang, C., Wang, S., Shih, M., Hu, H. & Liao, H. (2012). The anti-leukemic lectins from *Canavalia ensiformis* induce macrophage differentiation through cross-regulation between monocytes and lymphocytes. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(3), 534-543.
27. Cheng, W., Shivshankar, P., Zhong, Y., Chen, D., Li, Z., & Zhong, G. (2008). Intracellular Interleukin-1 $\alpha$  Mediates Interleukin-8 Production Induced by *Chlamydia trachomatis* Infection via a Mechanism Independent of Type I Interleukin-1 Receptor. *Infection and Immunity*, 76(3), 942–951. <http://doi.org/10.1128/IAI.01313-07>.
28. Cheung, A.H., Wong, J.H., Ng, T.B. (2009). *Musa acuminata* (Del Monte banana) lectin is a fructose-binding lectin with cytokine-inducing activity. *Phytomedicine*, 16(6-7), 594-600. doi: 10.1016/j.phymed.2008.12.016.
29. Chilson, O.P., Kelly-Chilson, A.E. (1989). Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *European Journal Immunology*, 19(2), 389-96. doi:10.1002/eji.1830190225.
30. Clanchy, F., Holloway, A.C., Lari, R., Cameron, P.U., & Hamilton, J.A. (2006). Detection and properties of the human proliferative monocyte subpopulation. *Journal of Leukocyte Biology*, 79(4), 757-66. doi: 10.1189/jlb.0905522.
31. Cragg, G.M., Grothaus, P.G., Newman, D.J., Dantas, M. C., Nunes, D. C., Alves, D. (2009). Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. *Chemical Review*, 109(7), 3012-43. doi: 10.1021/cr900019j.

32. Crispín, J. C., & Tsokos, G. C. (2009). Human TCR- $\alpha\beta$ + CD4- CD8- T Cells Can Derive from CD8+ T Cells and Display an Inflammatory Effector Phenotype. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(7), 4675–4681. <http://doi.org/10.4049/jimmunol.0901533>.
33. de Amat, C. (2015). Determinación de la actividad mitogénica *in vitro* de lectinas de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) sobre poblaciones de linfocitos humanos de sangre periférica”. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú.
34. de Melo, C.M., Paim, B.A., Zecchin, K.G., Morari, J., Chiaratti, M.R., Correia, M.T., Barroso, L.C., Paiva, P.M. (2010a). Cramoll 1,4 lectin increases ROS production, calcium levels, and cytokine expression in treated spleen cells of rats. *Molecular Cell Biochemical*, 342(1-2), 163-169. doi: 10.1007/s11010-010-0480-z.
35. de Melo, C.M., de Castro, M.C., de Oliveira, A.P., Gomes, F.O., Pereira, V.R., Correia, M.T., Coelho, L.C., & Paiva, P.M. (2010b). Immunomodulatory response of Cramoll 1,4 lectin on experimental lymphocytes. *Phytotherapy Research*, 24(11), 1631-6. doi: 10.1002/ptr.3156.
36. de Melo, C., Melo, H., Correia, M., Coelho, L., da Silva, M., & Pereira, V. (2011). Mitogenic response and cytokine production induced by cramoll 1,4 lectin in splenocytes of inoculated mice. *Scandinavian Journal Immunology*, 73(2), 112-21. doi: 10.1111/j.1365-3083.2010.02490.x.
37. de Oliveira, P. S. S., Rêgo, M. J. B. de M., da Silva, R. R., Cavalcanti, M. B., Galdino, S. L., Correia, M. T. dos S., ... Pitta, M. G. da R. (2013). Cratylia mollis 1, 4 Lectin: A New Biotechnological Tool in IL-6, IL-17A, IL-22, and IL-23 Induction and Generation of Immunological Memory. *BioMed Research International*, 2013, 263968. <http://doi.org/10.1155/2013/263968>.
38. De Souza, L. P., Ferreira, Ramos, E. L. P., Santana, S. S., Silva, M. V., Santiago, F. M., Mineo, T. W. P., & Mineo, J. R. (2016). Lectins from *Synadenium carinatum* (ScLL) and *Artocarpus heterophyllus* (ArtinM) Are Able to Induce Beneficial Immunomodulatory Effects in a Murine Model for Treatment of *Toxoplasma gondii* Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 164. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00164>.

39. Duranti, M; Scarafoni, A; Gius, C; Negri, A. & Faoro, F. (1994). Heat-induced synthesis and tunicamycin-sensitive secretion of the putative storage glycoprotein conglutin  $\gamma$  from mature lupin seeds. *European Journal of Biochemistry*, 222(2), 387-393.
40. Duranti, M., Giu, C. S., & Scarafoni, A. (1995). Lectin-like activity of lupin seed conglutin  $\gamma$ , a glycoprotein previously referred to as a storage protein. *Journal of Experimental Botany*, 46 (6), 725-728. doi: 10.1093/jxb/46.6.725.
41. D'Acquisto, F., & Crompton, T. (2010), CD3+CD4–CD8– (double negative) T cells: saviours or villains of the immune response?. *Biochemical Pharmacology*, 82(4), 333-340 doi:10.1016/j.bcp.2011.05.019.
42. Eslick, J., Scatizzi, J.C., Albee, L., Bickel, E., Bradley, K., & Perlman, H. (2004). IL-4 and IL-10 inhibition of spontaneous monocyte apoptosis is associated with Flip upregulation. *Inflammation*, 28(3):139-45.
43. Espinoza, G.P. (2015). Lectins: A brief review. *Vitae, Revista de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, 22(1), 9-11. ISSN 0121-4004 / ISSN 2145-2660. doi: <http://dx.doi.org/10.17533/udea.vitae.v22n1a01>.
44. Esposito, E., & Cuzzocrea, S. (2009). TNF-alpha as a therapeutic target in inflammatory diseases, ischemia-reperfusion injury and trauma. *Current Medical Chemistry*, 16(24):3152-67.
45. Fan, J., Nishanian, P., Breen, E. C., McDonald, M., & Fahey, J. L. (1998). Cytokine Gene Expression in Normal Human Lymphocytes in Response to Stimulation. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5(3), 335–340.
46. Faheina, G.V., da Silveira, A.L., Cavalcanti, B.C., Ramos, M.V., Moraes, M.O., Pessoa, C., & Araújo, D.A. (2012). Antiproliferative effects of lectins from *Canavalia ensiformis* and *Canavalia brasiliensis* in human leukemia cell lines. *Toxicology In Vitro*, 26(7), 161-9. doi: 10.1016/j.tiv.2012.06.017.

47. Falcón, A., Beeckmans, S. & Van Driessche, E. (2000a). Investigation on the haemagglutinating activity occurring in three species of Lupins. *Cultivos Tropicales*, 21(1), 41-46.
48. Falcón, A., Beeckmans, S. & Van Driessche, E. (2000b). Partial purification and characterization of lectin-like activities from *Lupinus albus* seeds. *Cultivos Tropicales*, 21(4), 21-28.
49. Farag, S., & Caligiuri, M. (2006). Human natural killer cell development and biology. *Blood Reviews*, 20(3), 123-137. doi: 10.1016/j.blre.2005.10.001.
50. Fettelschoss, A., Kistowska, M., LeibundGut-Landmann, S., Beer, H.D., Johansen, P., Senti, G., Contassot, E., Bachmann, M.F., French, L.E., Oxenius, A., & Kündig, T.M. (2011). Inflammasome activation and IL-1 $\beta$  target IL-1 $\alpha$  for secretion as opposed to surface expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108(44), 18055-60. doi: 10.1073/pnas.1109176108.
51. Fohona, C., & Bi-Botti, Y. (2017). Current status of lectin-based cancer diagnosis and therapy. *AIMS Molecular Science*, 4(1), 1-27. doi: 10.3934/molsci.2017.1.1.
52. Folch, H., Eller, G., Mena, M. & Esquivel, P. (1983), Efecto supresor de altas dosis de Fitohemaglutinina en la respuesta inmune humoral y celular. *Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B*, 30, 203–210. doi:10.1111/j.1439-0450.1983.tb01835.x.
53. Fornasini, M., Castro, J., Villacrés, E., Narváez, L., Villamar, M.P., & Baldeón, M.E. (2012). Hypoglycemic effect of *Lupinus mutabilis* in healthy volunteers and subjects with dysglycemia. *Nutrición Hospitalaria*, 27(2), 425-33. doi: 10.1590/S0212-16112012000200012.
54. Gabius, H.J. (2001). Probing the cons and pros of lectin-induced immunomodulation: case studies for the mistletoe lectin and galectin-1. *Biochimie*, 83(7), 659-66.
55. Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., & Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 327(5966), 656–661. <http://doi.org/10.1126/science.1178331>.

56. Giraldo, N.A., Bolaños, N.I., Cuellar, A., Guzman, F., Uribe, A.M.,..... González, J. (2011) Increased CD4+/CD8+ Double-Positive T Cells in Chronic Chagasic Patients. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 5(8), e1294. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001294>.
57. Goldstein, I., Hughes, R., Monsigny, M., Osawa, T. & Sharon, N. (1980). What should be called lectin? *Nature*, 285, 66.
58. Ghosh, D., & Maiti, T.K. (2007). Immunomodulatory and anti-tumor activities of native and heat denatured Abrus agglutinin. *Immunobiology*, 212(7), 589-99. doi:10.1016/j.imbio.2007.03.005.
59. Granell, A., Fernández, A., & Orzáez, D. (2010). In planta production of plant-derived and non-plant-derived adjuvants. *Expert Review of Vaccines*, 9(8), 843-58. doi: 10.1586/erv.10.80.
60. Gómez, E., Pascual, D., Brieva, J.A., Campos, A & Bootello, A. (1982). Relación entre concentración de linfocitos T humanos y su actividad reguladora en cultivos: efectos de la concanavalina A y la irradiación. *Inmunología*, 1 (3), 103-110.
61. González L., Sáenz, E., Rodríguez, S., & Porras, O. (1991). Cuantificación de Linfocitos T mediante rosetas con glóbulos de carnero y respuesta mitogénica a Lectinas. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*, 13(1-2), 37- 42.
62. Gutierrez, A., Infantes, M., Pascual, G., & Zamora, J. (2016). Evaluación de los factores en el desamargado de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). *Agroindustrial Science*, 6, 145-149.
63. Guzmán-Partida, A., Félix-Favela, F., Mata-Haro, V., Lopez-Laredo, A., Urbano-Hernández, G., Robles-Burgueño, M., Candia-Plata, M., & Vázquez-Moreno, L. (2013). Identificación de la interacción de monocitos humanos con las lectinas de *Olneya tesota* (IF2) y *Phaseolus vulgaris* (PHA-L) por citometría de flujo. *Biotechnia*, 15(3), 3-7. doi:<http://dx.doi.org/10.18633/bt.v15i3.151>.
64. Hernández, P., Martín, O., Rodríguez, Y., & Ganem, F.A. (1999). Aplicaciones de las lectinas. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 15(2), 91-95. Recuperado en 14 de abril de 2017, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S086402891999000200002&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086402891999000200002&lng=es&tlng=es).

65. Hernández, P., Pérez, E., Martínez, L., Ortiz, B., & Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *REB*, 24(1), 21-27.
66. Hajto, T., Hostanska, K., & Gabius, H.J. (1989). Modulatory potency of the b-galactoside-specific lectin from mistletoe extract (Iscador) on the host defense system in vitro in rabbits and patients. *Cancer Research*, 49, 4803–8.
67. Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. & Gabius, H.J. (1990). Increased Secretion of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ , Interleukin 1, and Interleukin 6 by Human Mononuclear Cells Exposed to  $\beta$ -Galactoside-specific Lectin from Clinically Applied Mistletoe Extract. *Cancer Research*, 50(11), 3322-3326.
68. Hajto, T., Hostanska, K., Weber, K., Zinke, H., Fischer, J., Mengs, U., Lentzen, H., & Saller, R. (1998). Effect of a recombinant lectin, *Viscum album* agglutinin on the secretion of interleukin-12 in cultured human peripheral blood mononuclear cells and on NK-cell-mediated cytotoxicity of rat splenocytes *in vitro* and *in vivo*. *Natural Immunology*, 16(1), 34-46.
69. Hajtő, T., Hostanska, K., Berki, T., Pálincás, L., Boldizsár, F., & Németh, P. (2005). Oncopharmacological Perspectives of a Plant Lectin (*Viscum album* Agglutinin-I): Overview of Recent Results from *In vitro* Experiments and *In vivo* Animal Models, and Their Possible Relevance for Clinical Applications. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 59–67. <http://doi.org/10.1093/ecam/neh058>.
70. Hostanska, K., Hajto, T., Spagnoli, G.C., Fischer, J., Lentzen, H. & Herrmann, R. (1995). A plant lectin derived from *Viscum album* induces cytokine gene expression and protein production in cultures of human peripheral blood mononuclear cells. *Natural Immunology*, 14(5-6), 295-304.
71. Hivrale, A.U. & Ingale, A.G. (2013). Plant as a plenteous reserve of lectin, *Plant Signaling & Behavior*, 8(12), e26595. doi: 10.4161/psb.26595.
72. Huamán, A., Chirinos-Arias, M., Solís, H., Sáez, G., Marocho, L., Guevara, J., Valencia, E. & Tapia, M. (2013). Evaluación *in vitro* de la

actividad antileishmanial y antitripanosomal del extracto acuoso de las hojas y semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet “tarwi”. *Anales de la Facultad de Medicina*, 74 Supl 1, S19.

73. Jacobsen, S. & Mujica, A. (2006). El tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) y sus parientes silvestres. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. Universidad Mayor de San Andrés, La Paz. 458-482.
74. Ji, J., Wang, X., Zhang, Y., & Liu, Y. (2016). Decidual and peripheral blood TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4-CD8- double negative regulatory T cells in early pregnancy subjects and unexplained recurrent spontaneous abortion patients. *International Journal of Clinical and Experimental Medical*, 9(4), 7184-7192. www.ijcem.com /ISSN: 1940-5901/IJCEM0020218.
75. Jiménez, E., Sacedón, R., Vicente, A., Hernández-López, C., Zapata, A.G., & Varas, A. (2002). Rat peripheral CD4+CD8+ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo post-thymic maturation to become functionally mature CD4+ T lymphocytes. *Journal Immunology*, 168 (10), 5005-5013. doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.168.10.5005>.
76. Jeune, K., Jung, S., Choi, K. (1999). Effects of mung bean lectin on cytokines gene expression from human peripheral blood mononuclear cells. *Korean Journal Pharmacology*, 30, 355–362
77. Kamisah, Y., Othman, F., Qodriyah, H.M., & Jaarin K. (2013). *Parkia speciosa* Hassk: A Potential Phytomedicine. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 709028, 9 pages. doi:10.1155/2013/709028.
78. Katamay, R., Liu, B., Li, Z., Wei, L., & Nussenblatt, R.B. (2011). Functional Mechanisms Of Concanavalin A (cona) Induced Regulatory T Cell Suppression In Humans. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52, 2929.
79. Kay, D. (1985). Legumbres alimenticias. Editorial Acribia. Zaragoza, España. Pp: 253-272.
80. Kilpatrick, D.C., & McCurrach, P.M. (1987). Wheat germ agglutinin is mitogenic, nonmitogenic and anti-mitogenic for human lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 25(4), 343-348.



81. Kim, S.-W., Choi, S.-M., Choo, Y. S., Kim, I.-K., Song, B.-W. & Kim, H.-S. (2015), Flt3 Ligand Induces Monocyte Proliferation and Enhances the Function of Monocyte-Derived Dendritic Cells In Vitro. *Journal of Cellular Physiology*, 230: 1740–1749. doi:10.1002/jcp.24824.
82. Kumar, S.V., Kumar, S.P., & Kumar, D.P. (2011). Immunomodulatory effects of some traditional medicinal plants. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3(1), 675-684.
83. Langstein, J., Michel, J., & Schwarz, H. (1999). CD137 Induces Proliferation and Endomitosis in Monocytes. *Blood*, 94(9), 3161-3168. Accessed October 17, 2017. Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/94/9/3161>.
84. Lari, R., Kitchener, P. D., & Hamilton, J. A. (2009). The proliferative human monocyte subpopulation contains osteoclast precursors. *Arthritis Research & Therapy*, 11(1), R23. <http://doi.org/10.1186/ar2616>.
85. Larrea, E., Garcia, N., Qian, C., Civeira, M. P. & Prieto, J. (1996), Tumor necrosis factor  $\alpha$  gene expression and the response to interferon in chronic hepatitis C. *Hepatology*, 23, 210–217. doi:10.1002/hep.510230203.
86. Lee, C.H., Kim, J.K., Kim, H.Y., Park, S.M., & Lee, S.M. (2009). Immunomodulating effects of Korean mistletoe lectin *in vitro* and *in vivo*. *Immunopharmacology*, 9(13-14), 1555-61. doi: 10.1016/j.intimp.2009.09.011.
87. Lei, H., & Chang, C. (2007). Induction of autophagy by concanavalin A and its application in anti-tumor therapy. *Autophagy*. 3(4), 402-4.
88. Li, M.C., & He, S.H. (2004). IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World Journal Gastroenterology*, 10(5), 620-5.
89. Li, Z., Liu, B., Casady, M., Dailey, J., Hirani, S., Jawad, S., Katamay, R., Sen, H.N., & Nussenblatt Robert. (2013). The Effect of Subsets of Monocytes on T cell activation and its implication in uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54, 2937.

90. López, A., & Ramos, A. (2008). El papel inmunorregulador del factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) en las infecciones parasitarias. *Revista Medica de la Universidad Veracruzana*, 8(1), 38-44.
91. Lyu, S.Y., Park, W.B. (2007). Effects of Korean mistletoe lectin (*Viscum album coloratum*) on proliferation and cytokine expression in human peripheral blood mononuclear cells and T-lymphocytes. *Archives of Pharmacal Research*, 30 (10), 1252-64.
92. Maciel, E.V., Araújo-Filho, V.S., Nakazawa, M., Gomes, Y.M., Coelho, L.C., & Correia, M.T. (2004). Mitogenic activity of *Cratylia mollis* lectin on human lymphocytes. *Biologicals*, 32(1), 57-60. doi:10.1016/j.biologicals.2003.12.001.
93. Magni, C; Sessa, F; Accardo, E; Vanoni, M; Morazzoni, P, Scarafoni, A & Duranti, M. (2004). Conglutin  $\gamma$ , a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 15(11), 646-650.
94. Männel, D.N., Becker, H., Gundt, A., Kist, A., & Franz, H. (1991). Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*. *Cancer Immunology Immunotherapy*, 33(3), 177-82.
95. Martinez, V., Periago, M. & Ros, G. (2000). Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(1), 1-19.
96. Majee, S. B. and Biswas, G.R. (2013). Exploring plant lectins in diagnosis, prophylaxis and therapy. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7(47), 3444-3451. doi: 10.5897/JMPR2013.5289.
97. Mia, S., Warnecke, A., Zhang, X.-M., Malmström, V., & Harris, R. A. (2014). An optimized Protocol for Human M2 Macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF- $\beta$  Yields a Dominant Immunosuppressive Phenotype. *Scandinavian Journal of Immunology*, 79(5), 305–314. <http://doi.org/10.1111/sji.12162>.
98. Millán-Linares, M., Bermúdez, B., Yust, M., Millán, F., & Pedroche, J. (2014a). Anti-inflammatory activity of lupine (*Lupinus angustifolius* L.) protein hydrolysates in THP-1-derived macrophages. *Journal of Functional Foods*, 8, 224-233. doi.org/10.1016/j.jff.2014.03.020.

99. Millán-Linares, M., Yust, M., Alcaide-Hidalgo, J., Millán, F., & Pedroche J. (2014b). Lupine protein hydrolysates inhibit enzymes involved in the inflammatory pathway. *Food Chemistry*, 15, 141–147. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.11.053.
100. Miyagi, T., Takehara, T., Tatsumi, T., Suzuki, T., Jinushi, M., Kanazawa, Y., Hiramatsu, N., Kanto, T., Tsuji, S., Hori, M., Hayashi, N. (2004). Concanavalin a injection activates intrahepatic innate immune cells to provoke an antitumor effect in murine liver. *Hepatology*, 40(5), 1190-6. doi:10.1002/hep.20447.
101. Monteiro, S., Freitas, R., Rajasekhar, B.T., Teixeira, A.R., & Ferreira, R.B. (2010). The unique biosynthetic route from lupinus beta-conglutin gene to blad. *PLoS One*, 5(1), e8542. doi: 10.1371/journal.pone.0008542.
102. Mouráo, R. H. V., De Melo, D. F., & Silva, M. (2000). Immunogenicity and Modulatory Effect of the Lectins from *Arthocarpus heterophyllus* (Jackfruit) Seeds, Artocarpin and Jacalin. *Acta Farmacología Bonaerense*, 19 (2), 109-113.
103. Mori, L. & Paz, R. (2008). Eliminación de alcaloides en el tarwi (*Lupinus mutabilis*) mediante lavado con agua a diferentes pH. *Revista Ciencias Biológicas*, 6, 48-53.
104. Mosser, D. M., & Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*, 226, 205–218. <http://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2008.00706.x>.
105. Munk, R. B., Sugiyama, K., Ghosh, P., Sasaki, C. Y., Rezanka, L., Banerjee, K., ... Longo, D. L. (2011). Antigen-Independent IFN- $\gamma$  Production by Human Naïve CD4<sup>+</sup> T Cells Activated by IL-12 Plus IL-18. *PLoS ONE*, 6(5), e18553. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018553>.
106. Naderi, J. (2015). Cellular Effects of Insulin in Human THP-1 Monocytes. Master's thesis. Norwegian University of Science and Technology. Retrieved from <https://brage.bibsys.no/xmlui/handle/11250/2351489>.

107. Ooi, L.S., Liu, F., Ooi, V.E., Ng, T.B., & Fung, M.C. (2002). Gene expression of immunomodulatory cytokines induced by *Narcissus tazetta* lectin in the mouse. *Biochem Cell Biol.* 80(2), 271-7.
108. Patwardhan, B., & Gautam, M. (2005). Botanical immunodrugs: scope and opportunities *Drug Discovery Today*, 10(7), 495-502.
109. Park, H.J., Hong, J.H., Kwon, H.J., Kim, Y., Lee, K.H., Kim, J.B., & Song, S.K. (2010). TLR4-mediated activation of mouse macrophages by Korean mistletoe lectin-C (KML-C). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 396(3), 721-725.
110. Parry, S.L., Sebbag, M., Feldmann, M., & Brennan, F.M. (1997). Contact with T cells modulates monocyte IL-10 production: role of T cell membrane TNF-alpha. *Journal Immunology*, 158(8), 3673-81.
111. Pereira-da-Silva, G., Geraldino, T.H., Modiano, P., Veronez, L.C., Lopes, R.O & Garcia, S.B. (2013). Jacalin has distinct immunomodulatory effects on early and late stages of experimental colon carcinogenesis. *Frontiers Immunology Conference Abstract: 15th International Congress of Immunology (ICI)*. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00246.
112. Peron, G. (2015). Tabhys: a peptide with lectin activity extracted from *Tabernaemontana hystrix*. Tesis de posgrado. Universidad de Sao Paulo, Riberão Preto, Brasil.
113. Pongracz, J., Parnell, S., Anderson, G., Jaffrézou, J.P., & Jenkinson, E. (2003). Con A activates an Akt/PKB dependent survival mechanism to modulate TCR induced cell death in double positive thymocytes. *Molecular Immunology*, 39(16), 1013-23.
114. Probert, L., Plows, D., Kontogeorgos, G., & Kollias, G. (1995). The type I interleukin-1 receptor acts in series with tumor necrosis factor (TNF) to induce arthritis in TNF-transgenic mice. *European Journal Immunology*, 25, 1794-1797.
115. Quispe, D. (2015). Composición nutricional de diez genotipos de Lupino (*L. mutabilis* y *L. albus*) desamargados por proceso acuoso. Tesis para Grado de Magister Scientiae. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima, Perú.

116. Ramasundaram, S., Narayanaperumal, P., Rathinasamy, S. D. (2005). Immunomodulatory Activity of *Triphala* on neutrophil functions. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 28(8), 1398-1403.
117. Reichert, T., Nagashima, S., Kashii, Y., Stanson, J., Gao, G., Dou, Q., Whiteside, T. (2000). Interleukin-2 expression in human carcinoma cell lines and its role in cell cycle progression. *Oncogene*, 19(4), 514-525. doi: 10.1038/sj.onc.1203391.
118. Reyes, B., & Gallegos, R. (2011). Lectinas vegetales: Una Alternativa Terapéutica para el Cáncer. *Desarrollo Científico Enfermería*, 19(5), 179-182.
119. Ribeiro, A.C.; Monteiro, S.V.; Carrapico, B.M. & Ferreira, R.B. (2014). Are vicilins another major class of legume lectins?. *Molecules*, 19(12), 20350-20373
120. Ribéreau-Gayon, G., Dumont, S., Muller, C., Jung, M.L., Poindron, P., & Anton, R. (1996). Mistletoe lectins I, II and III induce the production of cytokines by cultured human monocytes. *Cancer Letters*, 109(1-2), 33-38.
121. Rincón, M. (2014). Lectina de Leguminosas: significación nutricional, toxicidad y aplicaciones. Tesis de pregrado. Universidad de Valladolid. España.
122. Rodríguez, A. (2009). Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de los alcaloides de agua de cocción del proceso desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis de pregrado. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Ecuador.
123. Rodriguez, L. (2017), Caracterización bioquímica de lectinas de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (tarwi) y evaluación de su potencial inmunomodulador sobre leucocitos polimorfonucleares humanos de sangre periférica. Tesis de pregrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
124. Román, A.; Rugeles, M.; Montoya, C. (2006). Papel de las células NKT invariantes en la respuesta inmune anti-viral. *Colombia Médica*, 37(2), 159-168.

125. Rosser, E.C., & Mauri, C. (2015). Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*, 42(4):607-12. doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.005.
126. Ruiz, V., Boffill, M., González, O., Masjuan, M., & Blanco, F. (2005). Efecto inmunomodulador de la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 24(1), 5-13. Recuperado en 31 de mayo de 2017, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S086403002005000100001&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S086403002005000100001&lng=es&tlng=es).
127. Ruiz, J.C., Betancur, D.A., & Segura, M.R. (2014). Bioactive vegetable proteins and peptides in lipid-lowering; nutraceutical potential. *Nutrición Hospitalaria*, 29(4), 776-84. doi: 10.3305/nh.2014.29.4.7208.
128. Sánchez, C., Gupta, M., & Santana, A.I. (2003). Actividad inmunomoduladora de las plantas (II). *Revista de Fitoterapia*, 3(1), 45-60.
129. Sanjabi, S., Oh, S.A., & Li, M.O. (2017). Regulation of the Immune Response by TGF- $\beta$ : From Conception to Autoimmunity and Infection. *Cold Spring Harbor Perspective Biology*, 9(6), pii: a022236. doi: 10.1101/cshperspect.a022236.
130. Saroj, P., Verma, M., Jha, K. K., & Pal, M. (2012). An Overview on Immunomodulation. *Journal of Advanced Scientific Research*, 3(1), 7-12.
131. Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., & Yoga Latha, L. (2011). Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants Extracts. *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10.
132. Sirtori CR, Lovati MR, Manzoni C, Castiglioni S, Duranti M, Magni C, Morandi S, D'Agostina A, Arnoldi A. (2004). Proteins of White lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. *J Nutr*; 134, 18–23.

133. Sosa, I. (2000). Influencia de dos métodos de extracción de un aislado protéico de lupino (*Lupinus mutabilis*) en sus propiedades funcionales. Tesis de Magister. UNALM. Lima – Perú.
134. Souza, M.A., Carvalho, F.C., Ruas, L.P., Ricci-Azevedo, R., & Roque-Barreira, M.C. (2013). The immunomodulatory effect of plant lectins: a review with emphasis on ArtinM properties. *Glycoconjugate Journal*, 30(7), 641-57. doi: 10.1007/s10719-012-9464-4.
135. Schoffski, P., Riggert, S., Fumoleau, P., et al. (2004) Phase I trial of intravenous aviscumine (rViscumin) in patients with solid tumors: a study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer New Drug Development Group. *Annals of Oncology*, 15, 1816-1824.
136. Sharon, N. & Liz, H. (1998). "Lectins". En: Delves, P y Roitt, I. (Ed), Encyclopedia of Immunology. Segunda edición. Londres, p. 1535–1541.
137. Shukla, S., Bajpai V., & Kim M. (2014). Plants as potential sources of natural immunomodulators. *Environmental Science and Bio/Technology*, 13(1), doi: 10.1007/s11157-012-9303-x.
138. Spielmann, J., Shukla, A., Brandsch, C., Hirche, F., Stangl, G. I., & Eder, K. (2007). Dietary Lupin Protein Lowers Triglyceride Concentrations in Liver and Plasma in Rats by Reducing Hepatic Gene Expression of Sterol Regulatory Element-Binding Protein-1c. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51, 387-392. DOI: 10.1159/000107720.
139. Stoika, R., Kashchak, N., Lutsik-Kordovsky, M., Boyko, M., & Tsyrlunyk, A. (2001). In vitro response of phagocytic cells to immunomodulating agents. *Medical Science Monitor*, 7(4), 652-8.
140. Stanilov, N. S., Miteva, L., Cirovski, G., & Stanilova, S. A. (2016). Increased transforming growth factor  $\beta$  and interleukin 10 transcripts in peripheral blood mononuclear cells of colorectal cancer patients. *Contemporary Oncology*, 20(6), 458–462. <http://doi.org/10.5114/wo.2016.65605>.
141. Suca, G. & Suca, C. (2015). Potencial del tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) como futura fuente proteínica y avances de su

desarrollo agroindustrial. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 18(2), 55-71.

142. Sullivan, Y. B., Landay, A. L., Zack, J. A., Kitchen, S. G., & Al-Harthi, L. (2001). Upregulation of CD4 on CD8+ T cells: CD4dimCD8bright T cells constitute an activated phenotype of CD8+ T cells. *Immunology*, 103(3), 270–280. <http://doi.org/10.1046/j.1365-2567.2001.01243.x>
143. Suvachittanont, W., & Jaranchavanapet, P. (2000). Mitogenic effect of *Parkia speciosa* seed lectin on human lymphocytes. *Planta Medica*, 66(8), 699-704. doi:10.1055/s-2000-9565.
144. Tapia, M. (2015). El Tarwi, Lupino Andino. Primera Edición, Octubre 2015. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/337555190/PUBLICACION-TARWI>.
145. Turrel-Davin, F., Venet, F., Monnin, C., Barbalat, V., Cerrato, E., Pachot, A., ... Monneret, G. (2011). mRNA-based approach to monitor recombinant gamma-interferon restoration of LPS-induced endotoxin tolerance. *Critical Care*, 15(5), R252. <http://doi.org/10.1186/cc10513>.
146. Terruzzi, I., Senesi, P., Magni, C., Montesano, A., Scarafoni, A., Luzi, L., & Duranti, M. (2011). Insulin-mimetic action of conglutin-γ, a lupin seed protein, in mouse myoblasts. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 21(3), 197-205. doi: 10.1016/j.numecd.2009.09.004.
147. Van Blitterswijk, W.J., Walborg, E.F., Jr., Feltkamp, C.A., Hilkmann, H.A., & Emmelot, P. (1976). Effect on glutaraldehyde fixation on lectin-mediated agglutination of mouse leukaemia cells. *Journal Cell Science* 21(3), 579-94.
148. Vázquez, A., Rivadeneyra, E., & Díaz, R. (2012). Lectinas en frutas y plantas comestibles: nuevas posibilidades de interacción entre la ciencia de los alimentos y la biomedicina. *Ciencia Uat*, 23(1), 60-66. ISSN 2007-0624.
149. Vélez, S., Camargo, J., Correa, P., & Anaya, J. (2004). Bases moleculares de la familia de la interleuquina-1. *Revista Colombiana de Reumatología*, 11 (1), 11-39.



150. Wong, K.L., Tai, J.J., Wong, W.C., Han, H., Sem, X., Yeap, W.H., Kourilsky, P., & Wong, S.C. (2011). Gene expression profiling reveals the defining features of the classical, intermediate, and nonclassical human monocyte subsets. *Blood*, 118(5), e16-31. doi: 10.1182/blood-2010-12-326355.
151. Yamakawa, Tamio. (2005). Studies on erythrocyte glycolipids. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 81(2), 52-63.
152. Yepes, A., Rodríguez, M., Enríquez, P., Zafra, H., Villegas, S., Barboza, Y. y Alvarado, P. (2009). Efecto antifúngico del extracto acuoso de semillas del chocho, *Lupinus mutabilis* sobre *Alternaria solani* y *Fusarium solani*. *Rebiol*, 29(1), 1-7.
153. Yorgancilar, M., & Bilgiçli, N. (2014). Chemical and nutritional changes in bitter and sweet lupin seeds (*Lupinus albus* L.) during bulgur production. *Journal of Food Science and Technology*, 51(7), 1384–1389. <http://doi.org/10.1007/s13197-012-0640-0>.
154. Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Kang, T.B., Her, E., Kim, S.H., Kim, K., Azuma, I., & Kim, J.B. (2001). Cellular and humoral adjuvant activity of lectins isolated from Korean mistletoe (*Viscum album coloratum*), *International Immunopharmacology*, 1, 881–889.
155. Yoon, T.J., Yoo, Y.C., Kang, T.B., Song, S.K., Lee, K.B., Her, E., Song, S.K., & Kim, J.B. (2003). Antitumor activity of the Korean mistletoe lectin is attributed to activation of macrophages and NK cells, *Archives of Pharmacal Research*, 26, 861–867.
156. Yu, H., Zhao, T., Wu, H., Pan, Y., Zhang, Q., Wang, K. ... Jin, Y. (2015). Pinellia ternata lectin exerts a pro-inflammatory effect on macrophages by inducing the release of pro-inflammatory cytokines, the activation of the nuclear factor-κB signaling pathway and the overproduction of reactive oxygen species. *International Journal of Molecular Medicine*, 36, 1127-1135. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2315>.
157. Zainuddin, A., Chua, K. H., Rahim, N. A., & Makpol, S. (2010). Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts. *BMC Molecular Biology*, 11, 59. <http://doi.org/10.1186/1471-2199-11-59>.

158. Ziegler-Heitbrock, L., Ancuta, P., Crowe, S., Dalod, M., Grau, V., Hart, D. N., Leenen, P. J., Liu, Y., MacPherson, G., Randolph, G. J., Scherberich, J., Schmitz, J., Shortman, K., Sozzani, S., Strobl, H., Zembala, M., Austyn, J. M., & Lutz, M. B. (2010). Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), e74-e80. Accessed October 17, 2017. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-02-258558>.
159. Zhen, A., Krutzik, S. R., Levin, B. R., Kasparian, S., Zack, J. A., & Kitchen, S. G. (2014). CD4 Ligation on Human Blood Monocytes Triggers Macrophage Differentiation and Enhances HIV Infection. *Journal of Virology*, 88(17), 9934–9946. <http://doi.org/10.1128/JVI.00616-14>.
160. Zhu, Y., & Sang, S. (2017). Phytochemicals in whole grain wheat and their health-promoting effects. *Molecular Nutrition Food Research*, 61(7), 1-23. doi: 10.1002/mnfr.201600852.

## 10. ANEXOS

### ANEXO 1. Soluciones para extracción de lectinas

Solución salina de extracción

Cloruro de sodio (0.15 M) .....	8.766 g
Cloruro de calcio (20 mM).....	2.94 g
Cloruro de manganeso (20 mM).....	3.96 g
Agua destilada c.s.p.....	1 L

Disolver todos los componentes. Almacenar a T° ambiente.

### ANEXO 2. Tampón para purificación parcial de lectina

Tampón HEPES (HEPES NaMnCa) para cromatografía de exclusión

HEPES (10 mM).....	2.383 g
Cloruro de sodio (0.15 M).....	8.766 g
Cloruro de calcio (2 mM) .....	0.294 g
Cloruro de manganeso (2 mM) .....	0.396 g
Agua destilada c.s.p. ....	1 L

Disolver todos los componentes con excepción del  $MnCl_2$ . Ajustar a pH 6.8 con KOH 2 N y posteriormente agregar el  $MnCl_2$ . Almacenar a T° ambiente.

### ANEXO 3. Reactivos para electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Solución acrilamida – bisacrilamida 30:0.8%

Tampón de gel concentrador SDS-PAGE

Tris base (0.25M).....	0.75 g
SDS (0.2%).....	0.05 g
Agua destilada c.s.p.....	25 mL

Disolver todos los componentes. Ajustar pH a 6.8 con ácido clorhídrico 1N.

Tampón de gel de resolución SDS-PAGE

Tris base (0.75 M).....	2.268 g
SDS (0.2%).....	0.05 g
Agua destilada c.s.p.....	25 mL

Disolver todos los componentes. Ajustar pH a 8.8 con ácido clorhídrico 1N.

Tampón de muestra SDS-PAGE (3X) no reductor

Tampón de gel concentrador.....	0.5 mL
SDS.....	0.04 g
Glicerol.....	0.2 mL
Azul de bromofenol 1%.....	2 gotas
Agua destilada c.s.p.....	2 mL

Agregar los componentes a un microtubo, homogeneizar y almacenar a -20°C.

Tampón de corrida SDS-PAGE (1X)

Tris base.....	3 g
Glicina.....	14.4g
SDS.....	1 g
Agua destilada c.s.p.....	1 L

Disolver todos los componentes. Almacenar a T° ambiente.

Gel de resolución 10% SDS-PAGE

Acrilamida – bisacrilamida 30:0.8%.....	2.24 mL
Tampón de gel de resolución SDS-PAGE.....	3.36 mL
Agua destilada.....	1.12 mL
TEMED.....	7 µL
Persulfato de amonio (APS) 10%.....	33 µL
Volumen total 6.76 mL. Mezclar los componentes, agregar el APS al final y cargar la cámara rápidamente.	

Gel concentrador 6%	
Acrilamida – bisacrilamida 30:0.8%.....	0.3 mL
Tampón de gel concentrador SDS-PAGE.....	0.8 mL
Agua destilada.....	0.4 mL
TEMED (N, N, N', N. tetrametiletilendiamina).....	5 µL
Persulfato de amonio (APS) 10%.....	10 µL
Volumen total 6.76 mL. Mezclar los componentes, agregar el APS al final, cargar la cámara rápidamente y colocar el peine.	

Solución colorante	
Etanol absoluto.....	40 mL
Ácido acético glacial.....	10 mL
Azul de Coomasie 1%.....	20 mL
Agua destilada c.s.p.....	100 mL
Mezclar todos los componentes. Almacenar a temperatura ambiente	

Solución decolorante	
Etanol absoluto.....	400 mL
Ácido acético glacial.....	100 mL
Agua destilada c.s.p.....	1 L
Mezclar todos los componentes. Almacenar a temperatura ambiente	

#### **ANEXO 4. Soluciones para tripsinización**

Solución salina 1X	
Cloruro de sodio (0.15 M).....	0.8766 g
Agua destilada c.s.p.....	100 mL

Disolver el NaCl. Almacenar a 4° C.

Tripsina 0.1%	
Tripsina porcina.....	10 mg
Solución salina 1X.....	10 mL
Disolver la tripsina porcina. Almacenar a -20 °C.	

#### **ANEXO 5. Buffer para electroforesis en gel de agarosa (Buffer TAE 10X)**

Tris base (0.4M).....	24.23 g
EDTA (10mM).....	1.86 g
Ácido acético glacial (200mM).....	5.72 mL
Adua destilada c.s.p.....	500 mL
Mezclar todos los componentes. Para su uso diluir 1/10. Almacenar a temperatura ambiente.	

**ANEXO 6.** Porcentaje de poblaciones de células mononucleares de sangre periférica humana, determinados por análisis de citometría de flujo

POBLACIÓN	F9-PI 5 µg/mL		F9-PI 25 µg/mL		EPG5 µg/mL		PHA5 µg/mL		CONTROL	
	EVENTOS	% PARENT	EVENTOS	% PARENT	EVENTOS	% PARENT	EVENTOS	% PARENT	EVENTOS	% PARENT
TOTAL EVENTOS	100000		100000		100000		100000		110000	
SINGLETES	89810	89,8	93755	93,8	89921	89,9	89745	89,7	99077	90,1
LINFOCITOS FSC SSC	40156	44,7	16548	17,7	41293	45,9	34465	38,4	45249	45,7
LINFOCITOS CD45+	40033	99,7	16451	99,4	41146	99,6	34068	98,8	45069	99,6
LINFOCITOS CD3+	27718	69,2	7497	45,6	28444	69,1	22379	65,7	31128	69,1
LINFOCITOS CD4+CD8- (LTh)	16807	60,6	4651	62,0	17150	60,3	12087	54,0	18940	60,8
LINFOCITOS CD4+CD8+ (LTDP)	153	0,55	63,0	0,84	132	0,46	344	1,54	164	0,53
LINFOCITOS CD8+CD4- (LTc)	8943	32,3	2116	28,2	9190	32,3	8393	37,5	10026	32,2
LINFOCITOS CD4-CD8- (LTDN)	1815	6,55	667	8,90	1972	6,93	1555	6,95	1998	6,42
LINFOCITOS CD45+CD19+ (LB)	2920	7,29	2257	13,7	2816	6,84	2569	7,54	3372	7,48
LINFOCITOS CD45+CD3-CD16 bright (NK)	7469	18,7	4112	25,0	8064	19,6	7371	21,6	8522	18,9
LINFOCITOS CD45+CD3+CD16dim (NKT)	405	1,01	164	1,00	390	0,95	472	1,39	457	1,01
MONOCITOS	16032	17,9	27009	28,8	15145	16,8	17726	19,8	19501	19,7
MONOCITOS CD45+	15382	95,9	26325	97,5	14494	95,7	16665	94,0	18903	96,9
MONOCITOS CD4+	3243	21,1	9042	34,3	3099	21,4	4128	24,8	4234	22,4
MONOCITOS CD4+CD16-	3235	21	9042	34,3	3093	21,3	4230	25,4	4197	22,2
PERLAS	5201		4278		5314		5431		5655	